

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Biotekniikka

2016

Tiina Kuusisto

# HOMOGEENISEN KINAASIMÄÄRITYS- MENETELMÄN KEHITTÄMINEN TEHOSEULONTAAN

Tiina Kuusisto

# HOMOGEENISEN KINAASIMÄÄRITYSMENETELMÄN KEHITTÄMINEN TEHOSEULONTAAN

Opinnäytetyössä tutustutaan proteiinien jälkitranslationalisiin muokkauksiin, joista keskitytään fosforylaatioon ja erityisesti defosforylaatioon. Tavoitteena on kehittää homogeeninen vasta-aineeton entsyymiaktiivisuuden määrittymenetelmä, joka käyttää hyväkseen sammutus-resonanssienergiansiirtotekniikkaa (QRET). Työssä sidottiin yhteen peptidisubstraatti sekä europium-leimattu peptidi leusiinivetoketjurakenteessa. Fosfaattiryhmän ollessa kiinni peptidisubstraatissa sidosta ei synny ja reaktioseokseen lisättävä liukoinen sammutin pääsee reagoimaan europiumin kanssa sammuttaen tämän signaalin. Fosfaattiryhmä saadaan poistettua fosfataasientsyymien avulla, jolloin substraatti ja Eu-peptidi pääsevät sitoutumaan toisiinsa. Sidos estää sammuttimen reagoinnin europiumin kanssa, jolloin sammutin ei pääse sammuttamaan signaalia, ja saadaan suuri signaali. Inhibiittoreilla saadaan estettyä entsyymin toimintaa, ja työssä testattiin fosfataasientsyymien PTP1B toimintaa estäviä entsyymejä. Inhibiittori sitoutuu entsyymien aktiiviseen kohtaan ja estää substraatin sitoutumisen entsyymiin; kyseessä siis kilpaileva esto. Mittaukset tehtiin mikrotiitterilevyformaatissa mittaamalla aikaerotteista luminesenssia.

Työssä etsittiin reaktioon sopivat substraatti-, Eu-peptidi- ja entsyymikonsentraatiot. Mitattiin entsyymikinetiikkaa ja määritettiin inhibiittorien  $IC_{50}$  -arvot. Lisäksi tehtiin kaksoismääritys kinaasientsyymeillä, joissa käytettiin kahta eri kinaasientsyymiä sekä näille spesifisiä peptidisubstraatteja sekä inhibiittoreita. Testattiin universaalia inhibiittoria, joka estää kummankin entsyymin toimintaa.

## ASIASANAT:

translaationaalinen proteiinimodifikaatio, fosforylaatio, defosforylaatio, aikaerotteinen luminesenssi, sammutus-resonanssienergiansiirtotekniikka,

Tiina Kuusisto

## DEVELOPMENT OF HOMOGENEOUS KINASE ASSAY FOR HIGH THROUGHPUT SCREENING

The objective of this thesis was to study post-translational modifications, concentrating on phosphorylation and especially dephosphorylation. The aim was to develop a homogeneous, antibody-free method for enzyme activity assay which uses the quenching resonance energy transfer (QRET) technique. In this thesis, the peptide substrate and Eu-labeled peptide were bound together in a leucine zipper. When the phosphate group is attached to the peptide substrate, there is no binding and the soluble quencher added to the reaction reacts with the europium and quenches the signal. The phosphate group can be detached by phosphatase enzyme. Removing the phosphate enables the binding of the substrate and the Eu-labeled peptide. The binding prevents the quencher from reacting with the europium and it cannot quench the signal. This is how the high signal is measured. Enzyme activity can be blocked with inhibitors. In this thesis, the inhibitors blocking the phosphatase enzyme PTP1B were tested. When the inhibitor binds to the active site of the enzyme, it prevents the substrate from binding to the enzyme. This is called competitive inhibition. The measurements were performed in microtiter plate format by measuring time-resolved luminescence.

First the suitable concentrations of substrate, Eu-labeled peptide and enzyme were specified. The enzyme kinetics were measured and the  $IC_{50}$  values of the inhibitors were determined. Furthermore, the dual assays were performed with two different kinase enzymes and the specific peptide substrates and inhibitors for the enzymes. A universal dual inhibitor that blocks both enzymes was also tested in a reaction.

### KEYWORDS:

protein post-translational modification, phosphorylation, dephosphorylation, time-resolved luminescence, quenching resonance energy transfer

# SISÄLTÖ

<b>KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO</b>	<b>7</b>
<b>1 JOHDANTO</b>	<b>8</b>
<b>2 JÄLKITRANSLAATIONAALISET MUOKKAUKSET</b>	<b>9</b>
2.1 Fosforylaatio	10
2.2 Asetylaatio	12
2.3 SUMOlaatio	13
2.4 Sulfaatio	14
2.5 Metylaatio	15
<b>3 LEUSIINIVETOKETJU</b>	<b>17</b>
<b>4 REAKTION TARKASTELU</b>	<b>19</b>
4.1 Peptidisubstraatti	19
4.2 Europium-leimattu peptidi	19
4.3 Sammutin	20
4.4 Entsyymi	20
4.5 Inhibiittorit	22
4.6 Kaksoismääritykset	25
<b>5 QRET-TEKNIikka</b>	<b>27</b>
5.1 Aikaerotteinen luminesenssi	28
5.2 Muut tekniikat	30
<b>6 MATERIAALIT JA MENETELMÄT</b>	<b>32</b>
6.1 Eu-peptidin leimaus	32
6.2 Peptidisubstraatin valinta	33
6.3 Peptidikonsentraation valinta	34
6.4 Entsyymikonsentraation valinta	35
6.5 Kinetiikka	36
6.6 Inhibiittorititraus	37
6.7 Samanaikaiset määritykset	37
<b>7 TULOKSET</b>	<b>41</b>

7.1 Peptidisubstraatin valinta	41
7.2 Kinetiikka	43
7.3 Inhibiittorititraus	44
7.4 Kaksoismääritykset	45

<b>8 TULOSTEN TARKASTELU</b>	<b>48</b>
------------------------------	-----------

<b>9 LOPPUPÄÄTELMÄT</b>	<b>51</b>
-------------------------	-----------

<b>LÄHTEET</b>	<b>52</b>
----------------	-----------

## KUVAT

Kuva 1 Fosforylaation mekanismi (ThermoFisher 2016)	11
Kuva 2 Fosforylaatio ja defosforylaatio (ThermoFisher 2016)	12
Kuva 3 Lysiiniasetylaatio ja -deasetylaatio (CaymanChemical 2016)	13
Kuva 4 Sulfaatio (Chemistry & Biology 2000, Vol 7 No 3)	15
Kuva 5 Metylaatio (Trends in Biochemical Sciences, Vol 23, Issue 3)	16
Kuva 6 Leusiinivetoketjurakenne (Krylov & Vinson 2001)	17
Kuva 7 Leusiinivetoketju (Llorca ym. 2014)	18
Kuva 8 Kilpaileva ja ei-kilpaileva inhibiatio	23
Kuva 9 Natriumortovanadaatti (Selleckchem.com)	24
Kuva 10 Inhibiittori TCS 401 (Tocris)	24
Kuva 11 QRET-tekniikka	27
Kuva 12 Stokesin siirtymä	29
Kuva 13 Aikaerotteinen fluorometria (PerkinElmer 2015)	30

## KUVIOT

Kuvio 1 Peptidisubstraatin valinta	41
Kuvio 2 Peptidien sitoutumistesti	42
Kuvio 3 Peptidisubstraatin valinta	43
Kuvio 4 Kinetiikkakuvaaja	44
Kuvio 5 Inhibiittorikuvaaja	45
Kuvio 6 EGFR/PKA -kuvaaja	46
Kuvio 7 PTP1B/EGFR -kuvaaja	47

## TAULUKOT

Taulukko 1 Peptidikonsentraation valinta	35
Taulukko 2 EGFR/PTP1B-pipetointitaulukko	39

Taulukko 3 PTP1B/EGFR -pipetointitaulukko	40
Taulukko 4 Inhibiittorien IC <sub>50</sub> -arvot	49

## KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO

Lyhenne	Lyhenteen selitys
QRET	<i>Quenching resonance energy transfer</i> , sammutusresonanssienergiansiirto
MO5	Peptidisubstraatti ilman fosfaattiryhmää
pMO5	Peptidisubstraatti, jossa fosfaattiryhmä
Eu	Europium
PTP1B	Tyrosiinifosfataasi 1B –entsyymi
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i> , tyrosiini-kinaasientsyymi
PKA	<i>Protein kinase A</i> , (seriini-/treoniini)kinaasientsyymi
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Natrium-ortovanadaatti, PTP1B-inhibiittori
TCS-401	PTP1B-inhibiittori
H-89	PKA-inhibiittori
AG-1478	EGFR-inhibiittori
Staurosporiini	Universaali inhibiittori
ATP	Adenosiinitrifosfaatti
ADP	Adenosiinidifosfaatti
Q	Sammutinmolekyyli
Leusiinivetoketju	Sidosrakenne, jossa joka 7. aminohappo on leusiini
TRL	<i>Time-resolved luminescence</i> , aikaerotteinen luminesenssi
EDTA	Etyleenidiamiinitetraetikkahappo
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

# 1 JOHDANTO

Opinnäytetyössä kehitetään uutta homogeenista kinaasimääritysmenetelmää tehoseulontaa varten. Opinnäytetyö on osa Turun yliopiston tutkimusprojektia, jossa kehitetään vasta-aineettomia menetelmiä proteiinien translaation jälkeiseen muokkaukseen. Menetelmiä käytetään hyödyksi lääkekehityksessä. Vasta-aineettomat menetelmät ovat kustannuksiltaan halvempia ja helpompia kehittää. Lisäksi niiden herkkyys on korkea ja menetelmät soveltuvat tehoseulontaan.

Nykyisin olemassa olevat kaupalliset menetelmät perustuvat vasta-aineiden käyttöön. Vasta-aineiden käyttö on kallista, sillä kinaasipaletin mittaamiseksi on tuotettava useita vasta-aineita. Kehitettävä menetelmä on homogeeninen, sillä siinä kaikki vaiheet voidaan tehdä yhdessä kuoppalevyn kuopassa ilman pesuvaiheita välissä.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on kehittää uusi entsyymiaktiivisuuden määrittäminen käyttäen hyväksi sammutusresonanssienergiansiirtotekniikkaa (QRET, *Quenching Resonance Energy Transfer*) ja aikaerotteista luminesenssia. Työssä keskitytään erityisesti defosforylaatioon ja tyrosiinifosfaatasientsyymien PTP1B käyttöön määrittämisessä. Lisäksi suoritetaan kaksoismääritys, jossa yhdessä 384-kuoppalevyn kuopassa tapahtuu kaksi toisistaan riippumatonta fosforylaatioreaktiota. Tarkoituksena löytää universaali inhibiittori, joka estää kummankin entsyymin toiminnan.



## 2 JÄLKITRANSLAATIONAALISET MUOKKAUKSET

Proteiinisynteesissä solu valmistaa proteiineja DNA:lta saadun emäsjärjestyksen mukaisesti. Synteesissä on kaksi eri vaihetta. Ensimmäinen vaihe, transkriptio, tapahtuu solun tumassa ja toinen vaihe, translaatio, tapahtuu solulimassa. Translaation jälkeen jotkut proteiinit tarvitsevat vielä kovalenttista muokkausta ennen kuin ovat täysin valmiita (Heino & Vuento 2014).

Proteiinitranslaation jälkeiset muokkaukset (PTM, *protein post-translational modification*) ovat tärkeimpiä säätelymekanismeja solujen transduktioprosesseissa, joita ohjaavat eri entsyymit. Näillä muokkausreaktioilla tehdään muutoksia translaatioissa tuotettuun aminohappoketjuun. Proteiinitranslaation jälkeisiä muutoksia voivat olla erilaisten funktionaalisten ryhmien poistaminen tai liittäminen kovalenttisesti aminohappoketjuun. Jälkitranslaationaalisia muokkauksia käytetään yleisimmin säätelemään solujen aktiivisuutta. Ne vaikuttavat solujen jakautumiseen, geeniekspressioon, proteiinien välisiin vuorovaikutuksiin sekä apoptoosiin eli solukuolemaan. Jälkitranslaationaalisia muokkauksia ovat mm. fosorylaatio, asetylaatio, metylaatio ja sulfonaatio, joista yleisimmät reaktiot ovat fosorylaatio ja asetylaatio. Nämä translaation jälkeiset muokkaukset säätelevät eri entsyymien aktivoitumista ja inaktivoitumista niiden ominaisella vaikutusreitillä. Proteiinitranslaation jälkeiset muokkaukset vaikuttavat sekä solun normaaliin toimintaan että erilaisten tautien syntyyn. Jälkitranslaationaaliset muokkaukset ovat tärkeässä osassa etsittäessä keinoja eri sairauksien hoitoon ja estämiseen. Tämän vuoksi entsyymit ja niiden aktivointi ja inhibointi ovat nousseet tärkeään asemaan lääkekehityksessä. Onkin suuri tarve kehittää sopivia menetelmiä tehoseulontaa varten (Tong-Ochoa ym. 2015; ThermoFisher Scientific 2016).

Proteiinitranslaation jälkeiset muokkaukset tapahtuvat aminohappojen sivuketjuissa tai peptidisidoksissa entsyymien avulla. Monet proteiinit pystyvät myös muokkaamaan itseään autokatalyyttisten alueidensa avulla. Jälkitranslaationaaliset muokkaukset voivat tapahtua missä tahansa vaiheessa proteiinin elinkaaressa. Muokkaukset voivat tapahtua heti proteiinitranslaation jälkeen esi-

merkiksi ohjaamaan proteiinien laskostumista tai proteiinin laskostumisen ja sijoittumisen jälkeen aktivoimaan tai inaktivoimaan proteiinin katalyyttistä aktiivisuutta. Proteiinissa voi tapahtua useampikin translaation jälkeinen muokkaus (ThermoFisher Scientific 2016).

Proteiinien ja niiden translaation jälkeisten muokkausten tutkiminen on erityisen tärkeää tutkittaessa sydänsairauksia, syöpää ja diabetesta (ThermoFisher Scientific 2016).

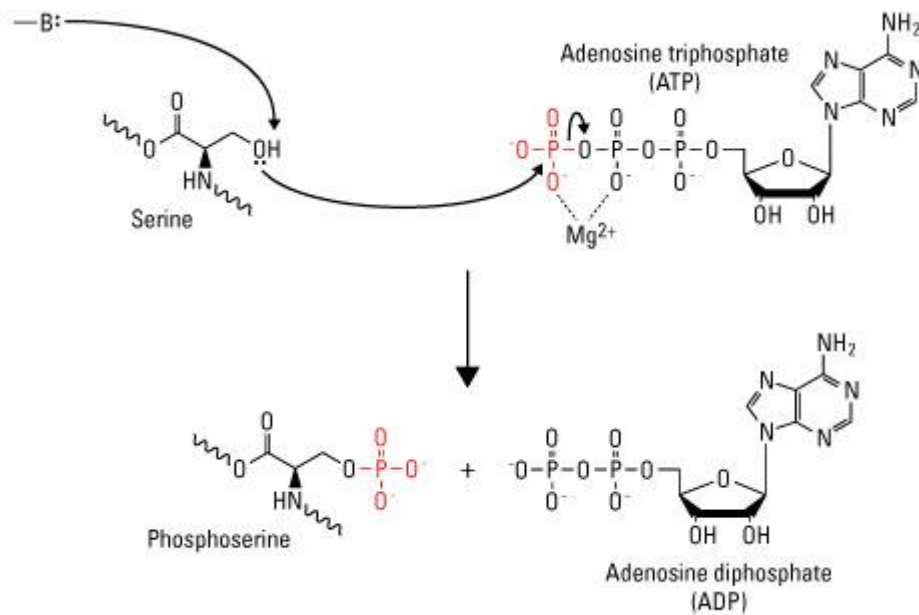
Seuraavassa on esitelty yleisimpiä jälkitranslaationaalisia muokkauksia.

## 2.1 Fosforylaatio

Fosforylaatio on yksi tärkeimmistä ja tutkituimmista proteiinitranslaation jälkeisistä muokkauksista eläinsoluissa. Fosforylaatiolla on tärkeä rooli monissa eukaryotisolujen säätelyprosesseissa, esimerkiksi solusykliissä ja apoptoosissa. Fosforylaatio on yleisin tapa kuljettaa signaaleita solussa (ThermoFisher Scientific 2016).

Eri kinaasientsyymit fosforyloivat eukaryoottisoluissa yleisesti kolmea aminohappoa; seriiniä, treoniinia ja tyrosiinia. Näillä kolmella aminohapolla on nukleoofiilinen ryhmä (-OH), joka kiinnittyy ATP-molekyylin päässä olevaan fosfaattiryhmään ( $\gamma\text{-PO}_3^{2-}$ ) siirtäen fosfaattiryhmän ATP:ltä aminohapolle. Tätä siirtoa avustaa magnesium ( $\text{Mg}^{2+}$ ). Reaktio on yksisuuntainen, sillä suuri määrä energiaa vapautuu ATP:n muuttuessa ADP:ksi fosfaatti-fosfaatti –sidoksen katketessa (Tong-Ochoa 2015; ThermoFisher Scientific 2016).

Fosforylaation mekanismi on kuvattuna kuvassa 1. Reaktio on samanlainen kuin opinnäytetyössä tehty tyrosiinifosforylaatio.

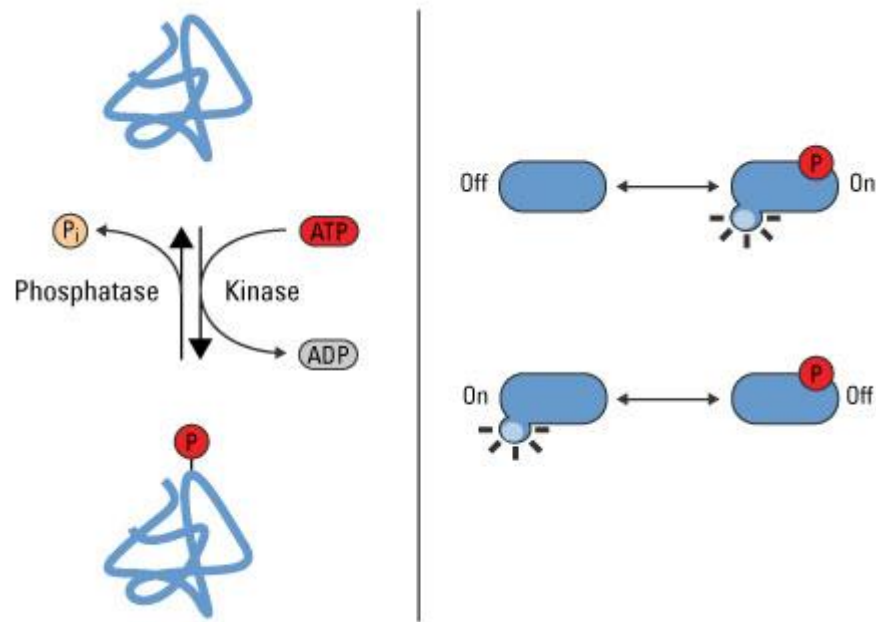


Kuva 1 Fosforylaation mekanismi (ThermoFisher 2016)

Reaktiota yksinkertaisesti kuvattuna:



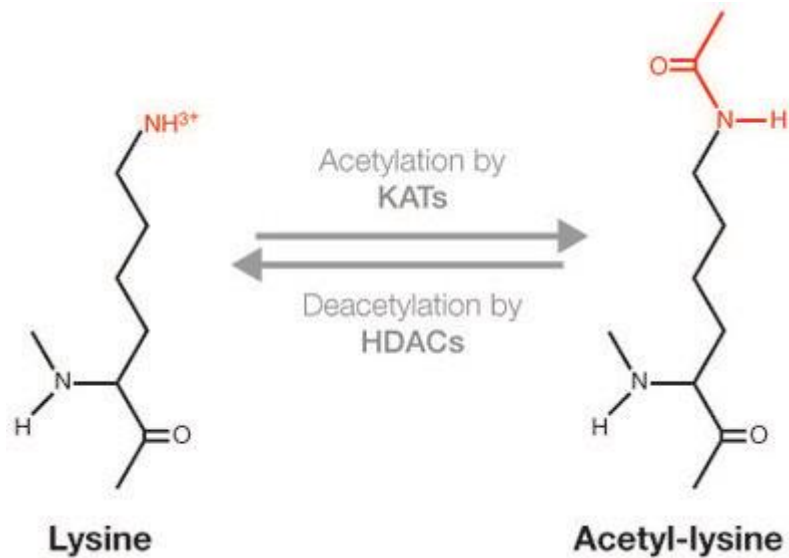
Prosessit, joita ohjaavat proteiinien fosforylaatio, vaativat proteiinkinaasin lisäksi myös proteiinifosfataasin, sillä fosforylaatio on reversiibeli eli palautuva reaktio ja sen vastareaktio on defosforylaatio (kuva 2). Kinaasientsyymi fosforyloi eli siirtää fosfaattiryhmän ATP:ltä aminohapoketjulle. Fosfataasientsyymi puolestaan defosforyloi eli siirtää fosfaattiryhmän pois aminohappoketjulta. Fosforylaatio muuttaa proteiinin konformaatiota ja voi joko aktivoida tai inaktivoida proteiinin toimintaa. Monet solujen proteiinit aktivoituvat tai inaktivoituvat fosforylaation avulla, ja kinaaseja säädellään autofosforylaation avulla (Hunter 1995; ThermoFisher Scientific 2016).



Kuva 2 Fosforylaatio ja defosforylaatio (ThermoFisher 2016)

## 2.2 Asetylaatio

Asetylaatio on yksi proteiinitranslaation jälkeisistä muokkausreaktioista, jolla on tärkeä rooli proteiinien toimintojen ja geeniekspression säätelyssä. Monilla transkriptionaalisilla koaktivaattoreilla on sisäistä asetylaasiaktiivisuutta. Asetylaatioissa orgaaniseen yhdisteeseen lisätään asetyyli ryhmä ( $-\text{CH}_3\text{CO}$ ). Asetylaatio on fosforylaation tapaan reversiibeli eli palautuva reaktio, jonka vastareaktio on deasetylaatio. Asetylaatioissa transferaasientsyymit siirtävät asetyyli ryhmän kohdeproteiinille. (Brock 2010; Mostoslavsky 2012).



Kuva 3 Lysiiniasetylaatio ja -deasetylaatio (CaymanChemical 2016)

Asetylaatioreaktioita on useita. Yleinen asetylaatioreaktio eukaryooteissa on N $\alpha$ -terminaalinen asetylaatio. Noin puolet hiivaproteiineista ja lähes kaikki ihmisen proteiineista muokataan tällä tavalla. N $\alpha$ -asetyyli transferaasi (NAT) siirtävät asetyyli ryhmän asetyyli koentsyymi A:lta proteiinin amiiniryhmälle. Näitä transfereaseja on kolmea tyyppiä; A, B ja C. Jokainen on spesifinen omalle substraatilleen (Mandal 2013).

Lysiiniasetylaatio tapahtuu lysiinissä N-terminaalisisessa päässä (kuva 3). Reaktiossa entsyyminä on usein histoniasetyyli transferaasi (HAT) tai deasetylaatioissa histonideasetylaasi (HDAC) (Mandal 2013).

### 2.3 SUMOlaatio

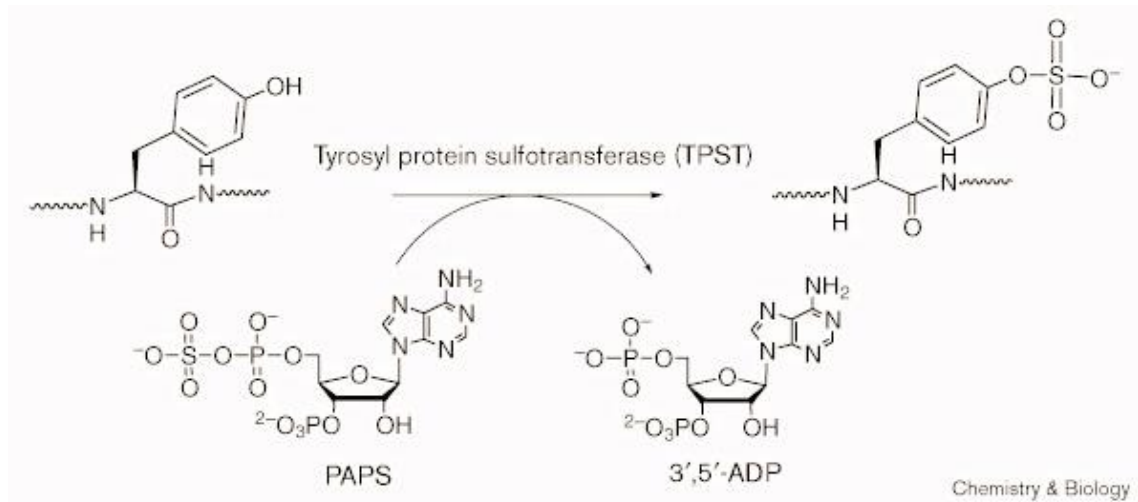
SUMO-proteiinit (SUMO, *Small ubiquitin-like modifier*) ovat sekä rakenteellisesti että mekaanisesti sukua ubikitiinille, eli eukaryoottisoluista löytyville pienille proteiineille, jotka muokkaavat ja hajottavat toisia proteiineja. SUMO-proteiini liitetään kolmiosisaisen entsyymijärjestelmän kautta toisiin proteiineihin. Sen tehtävänä on säädellä proteiinien sitoutumista solun sisällä (Heino & Vuento 2014).

SUMOLAATIO on eräs tärkeä proteiinitranslaation jälkeinen muokkausprosessi eukaryoottisolussa, jossa entsyymit E1, E2 ja E3 liittävät kohdeproteiineihin SUMO-proteiinin kovalenttisesti. SUMO kiinnittyy amidisidoksen avulla C-terminus -päästään substraattiproteiinin lysiinipään aminoryhmään. SUMO aktivoituu ensin heterodimeerisellä entsyymillä, joka käyttää ATP:tä, josta vapautuu AMP:tä. Reaktio on muiden proteiinitranslaation jälkeisten muokkausprosessien tapaan reversiibeli eli palautuva. Reaktiossa käytettävät entsyymit ovat samanlaisia kuin ubikvitaaristen proteiinien reaktioissa (Hay 2001; Dihmen 2004; Smith 2015).

SUMOLAATIOlla on kriittinen rooli solusykliissä. Monia solusyklin säätelijöitä säädelään SUMOLAATION kautta. SUMOLAATIO vaikuttaa proteiinin sijaintiin, ja lisäksi SUMOLAATIO pystyy luomaan tai peittämään kosketuspintoja, säätelämään transkriptiotekijöiden aktiivisuutta ja lisäksi estämään proteiinin hajottamisen. SUMOLAATIO estää proteiinin ubikinaation eli solua ei merkitä ubikitiineilla, jotka ohjaavat proteasomit hajottamaan proteiinin, ja näin ollen pidentää proteiinin elinkaarta (Mikkonen 2013; Heino & Vuento 2014; Karolin & Vertegaal 2015).

## 2.4 Sulfaatio

Sulfaatiossa entsyymi liittää sulforyhmän toiseen molekyyliin. Reaktiota esiintyy lukuisissa monisoluisissa eukaryooteissa, ja se on osana monissa biologisissa prosesseissa, mm. hormonien säätelyssä ja virusten tunkeutumisessa soluun. Sulfaatio vaikuttaa proteiinin käyttäytymiseen ja ominaispiirteisiin, kuten entsyymiaktiivisuuteen, proteiinin elinkaareen ja proteiini-proteiini – vuorovaikutuksiin (Stone ym. 2009).

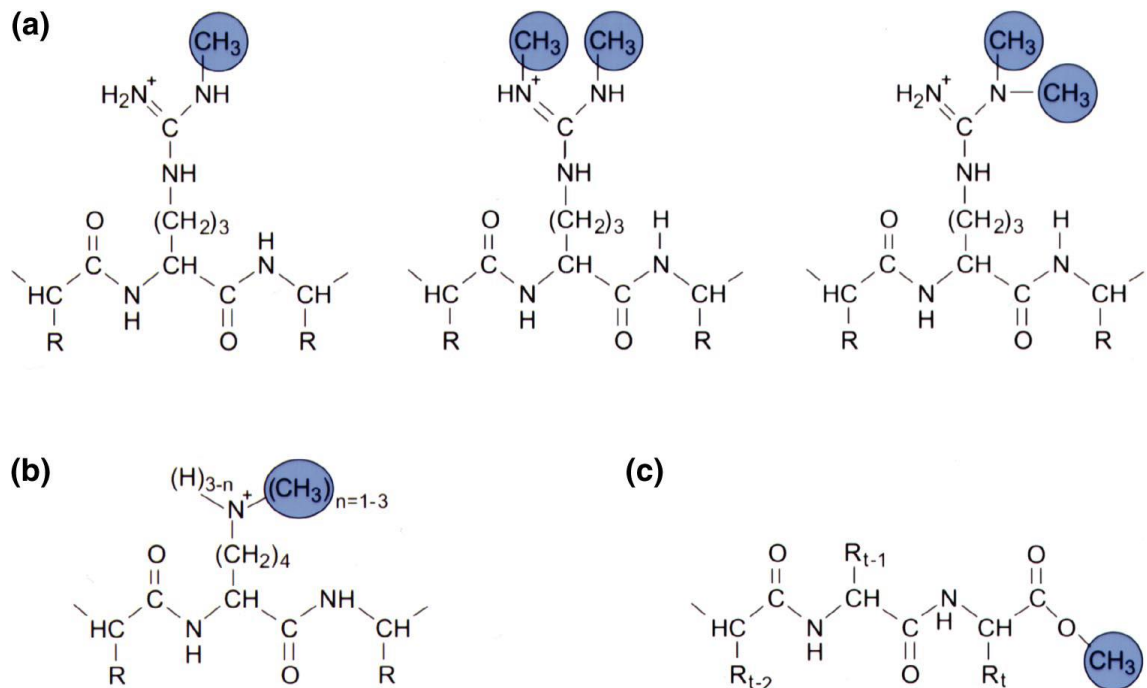


Kuva 4 Sulfaatio (Chemistry & Biology 2000, Vol 7 No 3)

Tyrosiinisulfaatio (kuva 4) on yksi proteiinitranslaation jälkeisistä muokkausprosesseista. Tässä proteiinin tyrosiinipäähän liitetään sulforyhmä entsyymin avulla. Reaktio tapahtuu Golgin laitteessa. Tyrosiiniproteiinisulfotransferaasi (TPST) käyttää 3'-fosfoadenosiini 5'-fosfosulfaattia (PAPS) sulfaatin luovuttajana. ATP ja epäorgaaninen sulfaatti muutetaan ensin 5'-fosfosulfaatiksi (APS) ATP-sulfuraasin avulla. APS-kinaasi fosforyloi APS:n tuottaakseen PAPS:in. Transferaasientsyymejä on kahta tyyppiä; TPST-1 ja TPST-2 (Kehoe & Bertozzi 2000; Stone, ym. 2009).

## 2.5 Metylaatio

Metylaatio on proteiinitranslaation jälkeinen muokkausprosessi, jossa metyyli-ryhmä ( $-\text{CH}_3$ ) siirretään esteröinnin avulla karboksyyli-ryhmään tai aminohappojen lysiini, arginiini tai histidiini sivuketjuihin. Proteiinimetylaatiolla on rooli proteiinien ikääntymisessä ja korjaamisessa (Aletta ym. 1998).



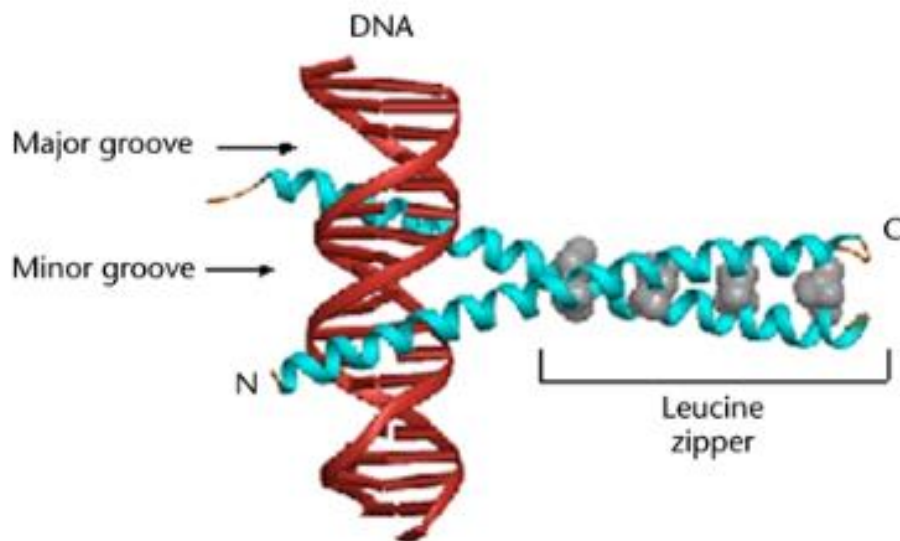
Kuva 5 Metylaatio (Trends in Biochemical Sciences, Vol 23, Issue 3)

Kuvassa 5 nähdään esimerkkejä proteiinien aminohappojen metylaatiosta. (a) Arginiiniin voidaan liittää yksi tai kaksi metyyliryhmää (mono- ja dimetylaatio), joista jälkimmäinen voi olla symmetrisessä tai epäsymmetrisessä konfiguraatiossa. (b) Lysiinin  $\epsilon$ -tyypin metylaatio voi tapahtua jopa kolmesti; mono-, di-, tai tridimetylaatio. (c) Metylaatio on tapahtunut proteiinin karboksyyli ryhmän C-terminaalisessa päässä (Aletta ym. 1998).



### 3 LEUSIINIVETOKETJU

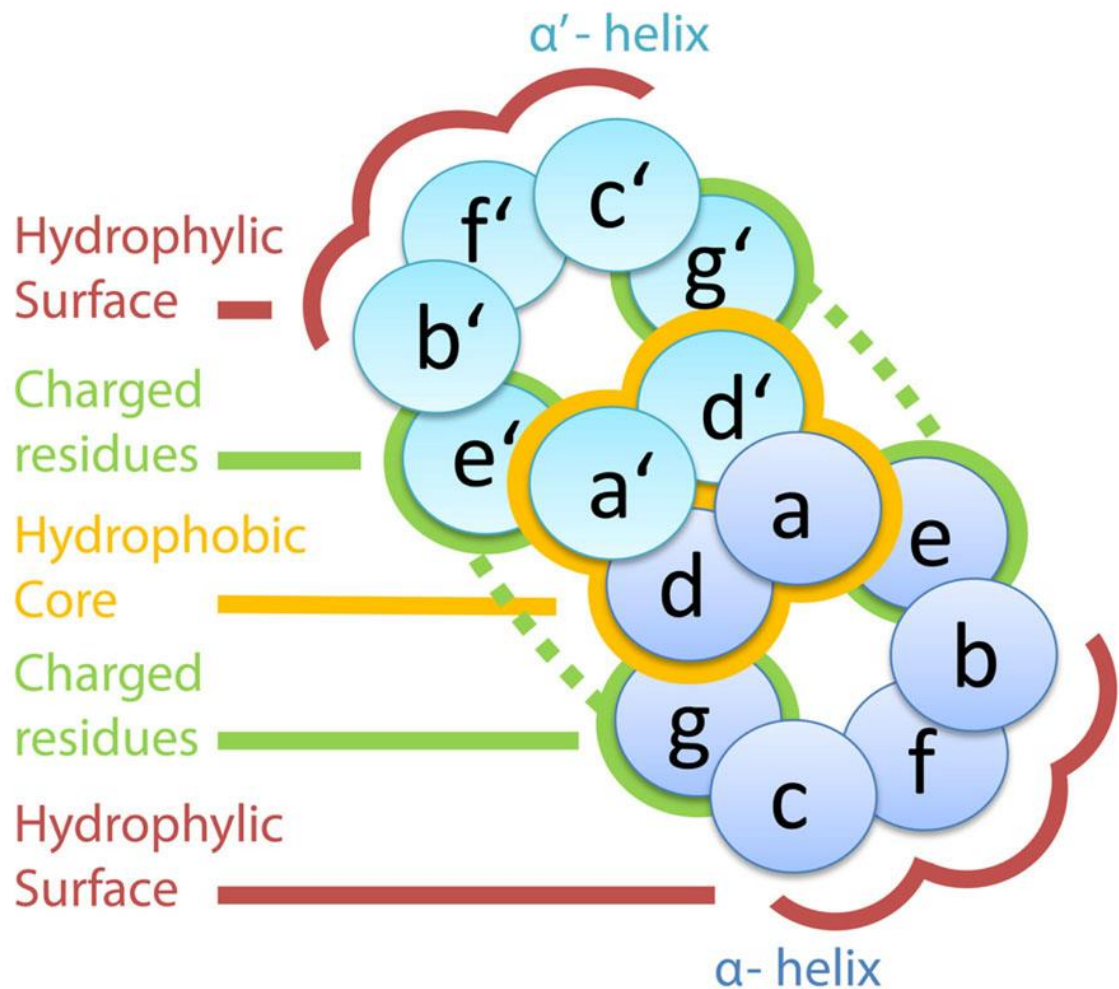
Leusiinivetoketju (ZIP, *leucine zipper*) on proteiinien vuorovaikutusalue, joka koostuu kahdesta amfipaattisesta  $\alpha$ -kierteestä eli heliksistä, jotka muodostavat kierrarakenteen (kuva 6). Joka seitsemäs aminohappo rakenteessa on leusiini, mistä rakenne saa nimensä. Tämä tietty aminohappojen järjestys toistuu leusiinivetoketjussa jatkuvasti. Heliksin hydrofobiset puolet kiinnittyvät toisiinsa poistaakseen polaarittomat aminohapot vedestä. Heliksin toinen puoli on hydrofiilinen, ja se reagoi veden kanssa. Hydrofobisten aminohappojen piiloutuminen rakenteen sisään mahdollistaa leusiinivetoketjurakenteen (kuva 7). Nimestään huolimatta peptidit eivät ole kovin tiukasti kiinni toisissaan (Krylov & Vinson 2001; Venäläinen 2015).



Kuva 6 Leusiinivetoketjurakenne (Krylov & Vinson 2001)

Leusiinivetoketjujen aminopäissä sijaitsevat aminohapot lysiini ja arginiini. Veto-  
ketjun aminopäät ovat kuin sakset, jotka sitoutuvat DNA-molekyylissä olevaan  
suureen uurteeseen.

Kuten kuvassa 7 nähdään, aminohapot kohdissa a ja d muodostavat hydrofobisen eli vesipakoisen ytimen, joista leusiinit ovat d-osissa. Aminohapot kohdissa e ja g tuottavat elektrostaattisia voimia. Aminohapot kohdissa b, c ja f luovat hydrofiilisen eli vesihakuisen pinnan leusiinivetoketjulle (Llorca ym. 2014).



Kuva 7 Leusiinivetoketju (Llorca ym. 2014)

Opinnäytetyössä leusiinivetoketjurakenne syntyy peptidisubstraatin ja europiumilla leimatun peptidin välisistä vuorovaikutuksista. Vetoketjurakenne suojaa europium-molekyyliä, jolloin sammutinmolekyyli ei pääse vaikuttamaan siihen. Fosfaattiryhmän ollessa kiinni peptidisubstraattissa, leusiinivetoketjusidos ei pääse syntymään. Reaktio on tarkemmin kuvattuna kuvassa 11.

## 4 REAKTION TARKASTELU

Defosforylaatioreaktioissa käytettiin leusiinivetoketjussa peptidisubstraattia sekä europiumilla leimattua peptidiä. Reaktiota havainnoitiin sammuttimen avulla mitaamalla aikaerotteista fluoresenssia. Varsinaisessa reaktiossa käytettiin myös fosfataasientsyymiä PTP1B sekä tätä entsyymiä estäviä inhibiittoreita, joita opinnäytetyössä testattiin. Kaksoismäärittelyssä seurattiin myös fosforylaatiota. Joko niin, että seurattiin sekä fosforylaatiota että defosforylaatiota samassa kaivossa tai kahta eri fosforylaatioreaktiota samassa kaivossa.

### 4.1 Peptidisubstraatti

Peptidisubstraatteina työssä käytettiin peptidejä MO5 ja pMO5, jotka ovat muuten sama peptidi mutta joista jälkimmäinen oli fosforyloitu synteettisesti. pMO5:lla ei ole konsensussekvenssiä käytetyille fosfataasientsyymille. Peptidisubstraatin sekvenssiä on muutettu affiniteetin parantamiseksi, jotta saadaan täytettyä entsyymin vaatimukset aktiivisuudelle.

### 4.2 Europium-leimattu peptidi

Europium (Eu) on yhdessä terbiumin (Tb), samariumin (Sm) ja dysprosiumin (Dy) kanssa lantanideja eli harvinaisia maametalleja. Näillä on pitkäikäinen ja voimakas fluoresenssi mutta jotta niistä saadaan sopiva fluoresoiva leima eli fluorofori, tulee lantanidi liittää kelaattiin. Tällöin lantanidien pieni molaarinen absorptiokerroin saadaan suuremmaksi lantanidin ja kelaatin muodostaessa orgaanisen kompleksin. Europium(III)kelaattien fluoresenssilla on pitkä elinikä, minkä takia europium(III)kelaatteja käytetään aikaerotteisen fluoresenssin mittauksessa. Taustafluoresenssin elinikä on lyhyt verrattuna europium(III)kelaatin pitkään elinikään (Nissinen 2011; Jacobino 2014).

Leimauksessa käytetty peptidi valittiin artikkelista, jossa oli tutkittu leusiiniveto-ketjuun sitoutuvia peptidejä. Käytetty peptidi leimattiin Europium-ligandilla liuot-tamalla ligandi ja peptidi toisiinsa (Kaplan ym. 2014).

#### 4.3 Sammutin

Sammuttimen tehtävänä reaktiossa on päästä reagoimaan europium-ligandin kanssa, jolloin se sammuttaa signaalin, ja saadaan mitatuksi matala aikaerot-teinen luminesenssisignaali. Kun reaktion kohdemolekyyli sitoutuu europium-leimatun ligandin kanssa, sammutin ei pääse reagoimaan ligandin kanssa, jol-loin etäisyys ligandin ja sammuttimen välillä kasvaa. Etäisyyden kasvaessa energiaa siirtyy vähemmän, mikä nostaa ligandin luminesenssin kestoa ja saa-daan mitatuksi suuri signaali (Kopra & Härmä 2015).

#### 4.4 Entsyymi

Entsyymit ovat biologisia katalyyttejä eli ne nopeuttavat solun kemiallisia reakti-voita alentamalla energiakynnystä (aktivaatioenergiaa), joka on ylitettävä, jotta lähtöaineet muuttuvat reaktiossa tuotteiksi. Entsyymit eivät vaikuta reaktioiden reaktiotasapainoon mutta ne nopeuttavat reaktioita jopa monimiljardikertaisesti katalysoimattomaan verrattuna. Erilaisia entsyymejä on tuhansia ja ne kataly-soivat kaikkia solussa tapahtuvia aineenvaihduntareaktioita. Joitakin entsyyme-jä valmistuu jatkuvasti eli niiden synteesi on konstitutiivista. Toiset entsyymit puolestaan ovat indusoivia eli entsyymi tarvitsee esimerkiksi substraatin tai hormonaalisen viestin laukaistakseen entsyymin synteesin. Entsyymiaktiivisuu-teen vaikuttavat mm. aktivaattorien ja inhibiittorien läsnäolo (Suominen ym. 2010; Heino & Vuento 2014).

Defosforylaatioreaktiossa käytettiin fosfataasientsyymiä PTP1B, joka irroittaa peptidistä fosfaattiryhmän. PTP1B kuuluu proteiinityrosiinifosfataaseihin (PTP, *protein tyrosine phosphatase*). PTP1B on solun sisäinen, solulimakalvostossa esiintyvä entsyymi. Entsyymiä löytyy kaikkialta elimistön kudoksista ja tärkein

proteiinityrosiinifosfaatti se on insuliinin kohdekudoksissa kuten lihaksessa, maksassa ja rasvassa. Entsyymi katalysoi fosfaattiestereiden hydrolyysiä. PTP1B säätelee useita solunsisäisiä prosesseja, kuten solukasvua, solujen erilaistumista, mitoosisynteesiä sekä solujen onkogeenistä muuttumista, jolloin solusta tulee syöpäsolu. Tämä entsyymi defosforyloi fosfotyrosiinikohtia insuliinireseptorikinaasissa, eli se toimii negatiivisena insuliinin säätelijänä kasvattaen insuliiniresistenssiä. Elimistön insuliinireseptori on tyrosiinikinaasi, ja PTP1B-entsyymillä on insuliinin signaalireitillä tärkeä osa. PTP1B lopettaa insuliinisignaalin solussa defosforyloimalla ja inaktivoimalla tämän insuliinireseptorin. Lisäksi PTP1B:ssä tapahtuvat muutokset saattavat olla syynä munasarja-, rinta- ja ruokatorvisyöpiin. PTP1B defosforyloi myös EGFR-kinaasia (*epidermal growth factor receptor*), mikä sekoittaa tämän entsyymin osaa solukasvun kontrolloinnissa ja soluvasteessa interferonin stimulaatiolle (Ukkola & Santaniemi 2002; SignalChem; GeneCards).

PTP1B-entsyymin on todettu olevan lupaava kohdelääke 2-typin diabeteksen ja ylipainon hoitoon. Lisäksi tällä entsyymillä on huomattu olevan kaksitahoinen yhteys syöpään. Tutkimukset osoittavat, että substraatista ja solun sisällöstä riippuen PTP1B voi joko tukahduttaa tai edistää syövän kasvua. Näiden löydösten valossa on tärkeä löytää tämän entsyymin toimintaa estävä inhibiittori, jotta syövän kasvuun, ylipainoon ja 2-typin diabetekseen saataisiin kehitettyä sopiva lääke (Ukkola & Santaniemi 2002; Lessard ym. 2010).

Opinnäytetyössä käytetyt kinaasit olivat PKA- ja EGFR-kinaasit. EGFR on reseptorityrosiinikinaasi. Se kontrolloi solukasvua ja solujen erilaistumista. Ligan din sitoutuessa tähän reseptoriin, se aiheuttaa reseptorin dimerisoitumista, autofosforylaatiota sekä erilaisten molekyylien aktivaatiota. EGFR:ää on löydetty ylimäärin erilaisista syöivistä, ja sen suuri määrä korreloi huonon selviytymisasteen kanssa (PhosphoSitePlus 2013).

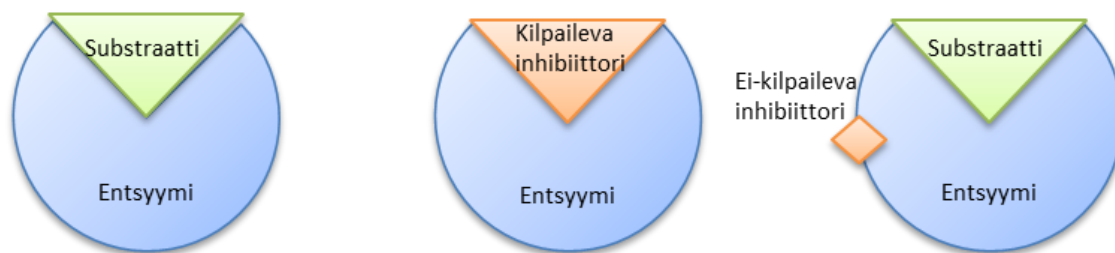
PKA eli proteiinikinaasi A on entsyymi, joka siirtää fosfaattiryhmän proteiineille. Proteiinikinaasi A:n aktiivisuutta säätelevät vaihtelevat määrät syklistä AMP:tä soluissa, ja sitä kutsutaan myös syklisestä AMP:stä riippuvaiseksi proteiinikinaasiksi. Proteiinikinaasi A on heterotetrameeri, joka muodostuu kahdesta

alaysiköstä; katalyyttisesta ja säätelevästä alaysiköstä. Katalyyttisessä alaysikössä sijaitsee alue, joka sitoutuu ATP:hen ja alue, joka sitoutuu säätelyalaysikköön. Katalyyttinen alaysikkö fosforyloi proteiineja seriini- ja treoniinialueista ja se pystyy fosforyloimaan substraatteja sekä sytoplasmassa että tumassa. PKA:lla on tärkeä osa energiametaboliassa, kalvokuljetuksissa sekä geeniekspressiossa (Bowen 2003).

#### 4.5 Inhibiittorit

Inhibiittorit estävät entsyymien toimintaa sitoutumalla niihin. Olemassa on inhibiittoreita, joiden toiminta on palautuvaa, ja inhibiittoreita, joiden toiminta on palautumatonta. Palautumattomat inhibiittorit, ns. ”itsemurhainhibiittorit”, sitoutuvat entsyymiin ja muuttuvat sitten erittäin reaktiivisiksi yhdisteiksi, jotka estävät entsyymien toiminnan täysin sitoutumalla siihen. Inhibiittorit sitoutuvat kovalenttisesti entsyymien aktiiviseen kohtaan muuntaen entsyymien pysyvästi estyneeseen muotoon. Palautumattomia inhibiittoreita kutsutaan myös mekanismiin perustuviksi inaktivaattoreiksi, sillä inhibiittorit käyttävät hyödykseen entsyymien reaktiomekanismia (Heino & Vuento 2014).

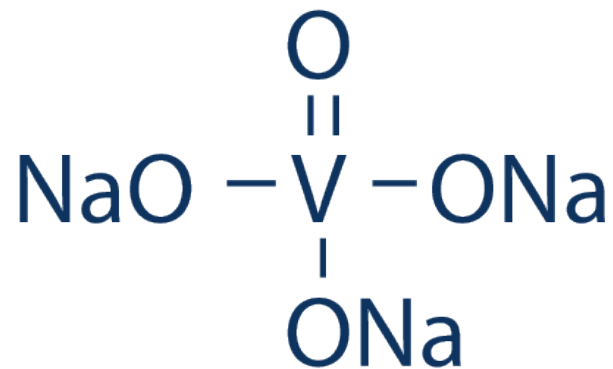
Palautuvat inhibiittorit voivat olla kompetitiivisia, nonkompetitiivisia tai unkompetitiivisia. Kompetitiiviset eli kilpailevat inhibiittorit joutuvat kilpailemaan sitoutumisesta entsyymiin substraatin kanssa, jolloin entsyymien aktiiviseen kohtaan muodostuu entsyymi-inhibiittorikompleksi. Tässä tapauksessa kilpaileva inhibiittori estää substraatin kiinnittymisen entsyymiin. Inhibiittori muistuttaa niin paljon substraattia, että se pystyy harhauttamaan entsyymien sitomaan itseään. Lääkeaineiden vaikutus perustuu usein kompetitiiviseen inhibitioon (Heino & Vuento 2014).



Kuva 8 Kilpaileva ja ei-kilpaileva inhibitio

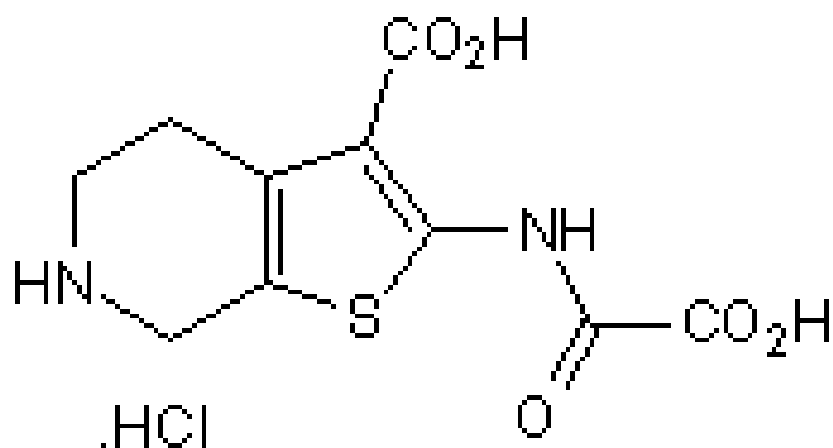
Nonkompetitiiviset ja unkompetitiiviset inhibiittorit sitoutuvat puolestaan entsyymien aktiivisen kohdan ulkopuolelle. Nonkompetitiiviset sitoutuvat entsyymiin aktiivisen kohdan ulkopuolelle, unkompetitiiviset sitoutuvat entsyymi-inhibiittorikompleksiin. Nonkompetitiivisessä inhibitiossa substraatti voi sitoutua entsyymien aktiiviseen kohtaan mutta reaktiotuotetta ei synny; vaikutus on sama kuin entsyymien pitoisuus pienisi. Unkompetitiivisessä inhibitiossa osa entsyymistä on jatkuvasti tuottamattomassa tilassa eikä reaktiotuotetta synny. Substraatin määrää lisäämällä on mahdollista kumota kompetitiivinen reaktio mutta ei-kompetitiiviseen inhibitioon sillä ei ole vaikutusta (Heino & Vuento 2014).

Inhibiittoreina työssä käytettiin kahta PTP1B-entsyymiä inhiboivaa inhibiittoria;  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  ja TCS-401. Käytetyt entsyymit ovat kompetitiivisia eli kilpailevia entsyymejä, jotka sitoutuvat entsyymien aktiiviseen kohtaan estäen substraatin sitoutumisen entsyymiin (Santa Cruz Biotechnology 2016; Tocris 2016).



Kuva 9 Natriumortovanadaatti (Selleckchem.com)

Natrium-ortovanadaatti ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) (kuva 9) on yleisesti käytetty inhibiittori proteiinifosfotyrosyylifosfataaseille, alkaalifosfataaseille (ALP) sekä ATPaaseille. Se on kilpaileva inhibiittori, joka toimii myös inhibiittorina adenosiinikinaasille (AK) ja fosfofruktokinaasille (PFK). Vanadium on metalli, joka esiintyy vesiliuoksissa hapetusluvuilla 4+ ja 5+ muodostaen vanadyyli- ja vanadaatti-ioneja. Vanadaatin inhibitioreaktio on palautuva; reaktioseokseen tulee lisätä EDTA:a tai se tulee laimentaa (New England BioLabs Inc. 2016; Sigma-Aldrich 2016).



Kuva 10 Inhibiittori TCS 401 (Tocris)



TCS-401 (kuva 10) on selektiivinen inhibiittori proteiinityrosiinifosfataasi 1B:lle (PTP1B). Inhibiittorin kohteena on erittäin suojeltu fosfaatin sitoutumissilmukka.

#### 4.6 Kaksoismääritykset

Kaksoismäärittelyllä tarkoitetaan määrittystä, jossa tehdään kaksi reaktiota saman kuoppalevyn samassa kuopassa. Reaktiot voivat olla kaksi toisistaan riippumatonta reaktiota, kuten kaksi eri fosforylaatioreaktiota, tai peräkkäin tapahtuvat reaktiot kuten fosforylaatio ja defosforylaatio.

Esimerkiksi kaksi fosforylaatioreaktiota, jossa on käytössä kaksi entsyymiä, joista kummallakin on omat peptidisubstraattinsa sekä inhibiittorinsa. Lisäksi mukana voi olla inhibiittori, joka estää kumpaakin entsyymiä toimimasta. Tarkoituksena on etsiä tällaisia inhibiittoreita, jotka pystyvät estämään useampaa entsyymiä toimimasta. Esimerkiksi inhibiittori A estää entsyymin PTP1B toiminnan mutta toinen entsyymi saa aktivoitua saman signaalireitin toisella tasolla, jolloin inhibiittori A on hyödytön. Sen sijaan tarvittaisiin inhibiittori, joka estää sekä PTP1B-entsyymin että toisen syöpää aiheuttavan entsyymin toiminnan, ja jota voitaisiin näin ollen käyttää esimerkiksi juuri syövän hoidossa.

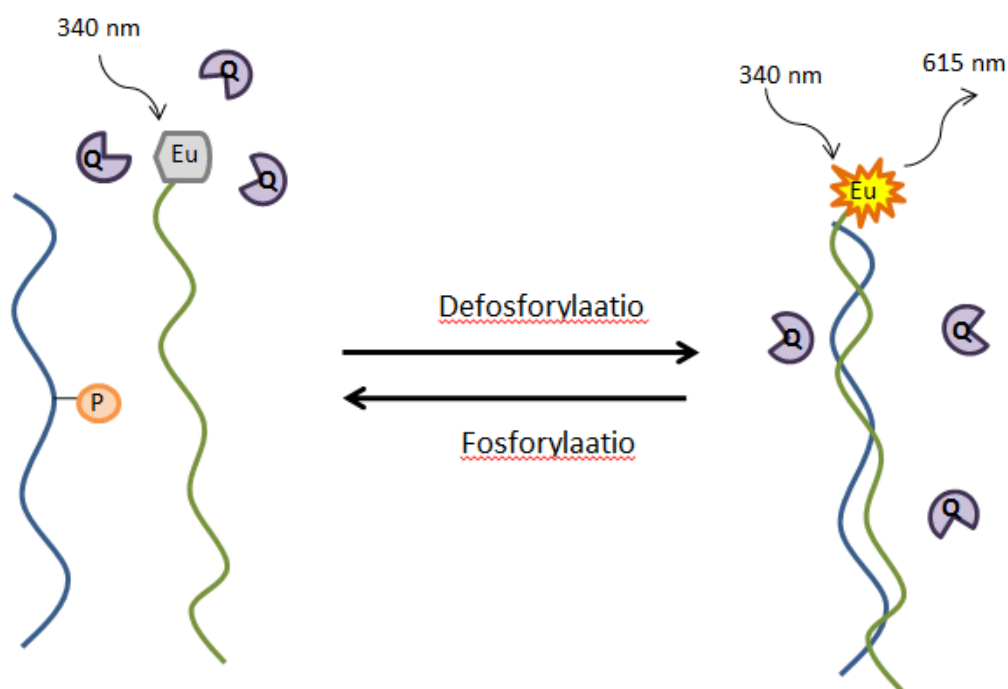
Kinaasimäärittelyksissä, joissa käytetään joko terbiumiin tai europiumiin perustuvaa aikaerotteisen fluoresenssin mittausta, voidaan kehittää määrittämenetelmä kahdelle kinaasille yhtäaikaaisesti samassa kuopassa. Kahdesta kinaasista samassa kuopassa saadaan enemmän tietoa levykuoppaa kohden mutta myös tietoa yhdisteen spesifisyydestä (Horton & Vogel 2010).

Tällaista monen kinaasin määrittystä tehtäessä tulee ensin erikseen määrittää sopivat pitoisuudet kummallekin kinaasientsyymille kummankin substraatin läsnäollessa (sekä kinaasille spesifisen että toiselle kinaasille spesifisen). Määrittelyksessä tulee käyttää reagensseja, joita tarvitaan kumpaankin määrittelykseen. Tämä tehdään, jotta määrittelykseen saadaan tarpeeksi kinaasientsyymiä määrittäystä varten sekä varmistamaan, ettei tutkittava kinaasientsyymi fosforyloi väärää substraattia. Kun sopiva konsentraatio kinaasille on saatu selvitettyä, tarkistetaan vielä, etteivät kinaasit häiritse toisiaan. On myös määritettävä spesifiset

inhibiittorit kummallekin entsyymille, sekä inhibiittori, joka estää kummankin ki-naasin toimintaa (Horton & Vogel 2010).

## 5 QRET-TEKNIikka

Sammutusresonanssienergiansiirto (QRET, *Quenching resonance energy transfer*) –tekniikka perustuu siihen, että liuokseen, jossa on sekä kohdemolekyyli että lantanidikelaatilla ( $\text{Eu}^{3+}$ ) leimattu ligandimolekyyli, lisätään liukoista sammutinta. Mikäli kohdemolekyyli ja leimattu ligandi ovat yhdistyneet toisiinsa, häiriintyy lantanidikelaatin sekä sammuttimen vuorovaikutus. Sammuttimen ja kelaatin keskinäinen etäisyys kasvaa, mikä alentaa energian siirtymistä kelaatin ja sammuttimen välillä ja aiheuttaa korkea signaalin mitattaessa aikaerotteista luminesenssia (TRL, *time-resolved luminescence*) (Kopra & Härmä, 2015).



Kuva 11 QRET-tekniikka

Mikäli sitoutumista kohdemolekyylin ja leimatun ligandin välillä ei tapahdu, sammuttimella ja kelaatilla on vuorovaikutusta keskenään, ja mitattu aikaerotteinen luminesenssi on matala. Kohdemolekyylin kanssa sitoutuminen suojaa

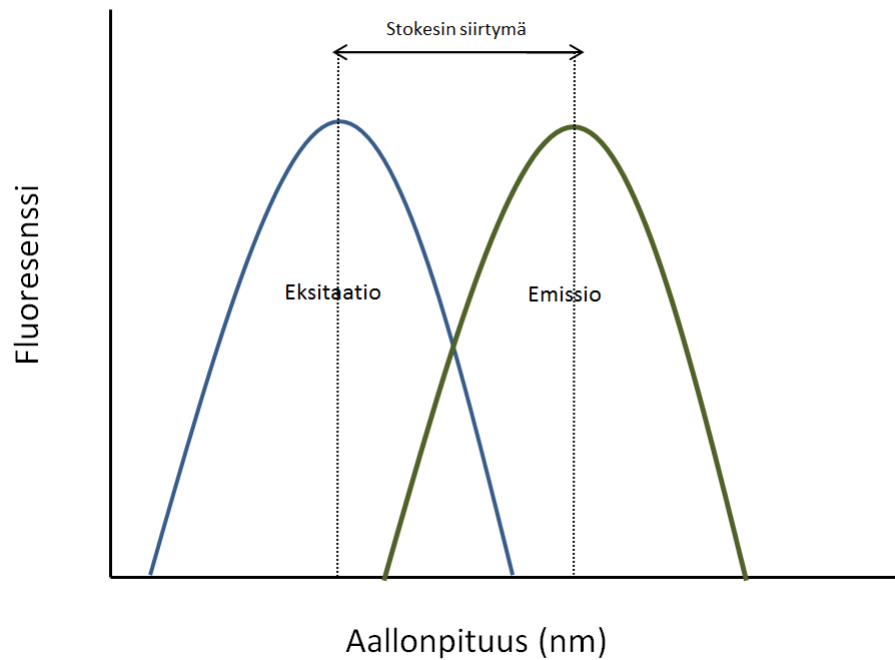
kelaattia, jolloin sammutin ei pääse hiljentämään signaalia, ja mitattu aikaerotteinen signaali pysyy korkeana (Kopra & Härmä, 2015).

Ligandi, joka leimataan, voi olla esimerkiksi DNA-fragmentti, peptidi, nukleotidi tai pienmolekyyli. Opinnäytetyössä käytettiin europium-leimattua peptidiä. QRET-tekniikkaan perustuva seulonta on helppo muokata uusille kohteille, mikäli on mahdollista leimata pieni ligandimolekyyli. Sammutinmolekyyli valitaan siten, että saadaan määrittäminen toimimaan parhaalla mahdollisella tavalla. Sammutinmolekyyli voi olla lähes mikä tahansa luminofori kunhan sen spektrillä on päällekkäisyyttä lantanidikelaatin emissiospektrin kanssa (Kopra & Härmä, 2015).

QRET-tekniikan etuja ovat sen nopeus, edullisuus ja herkkyys (Kopra & Härmä 2015).

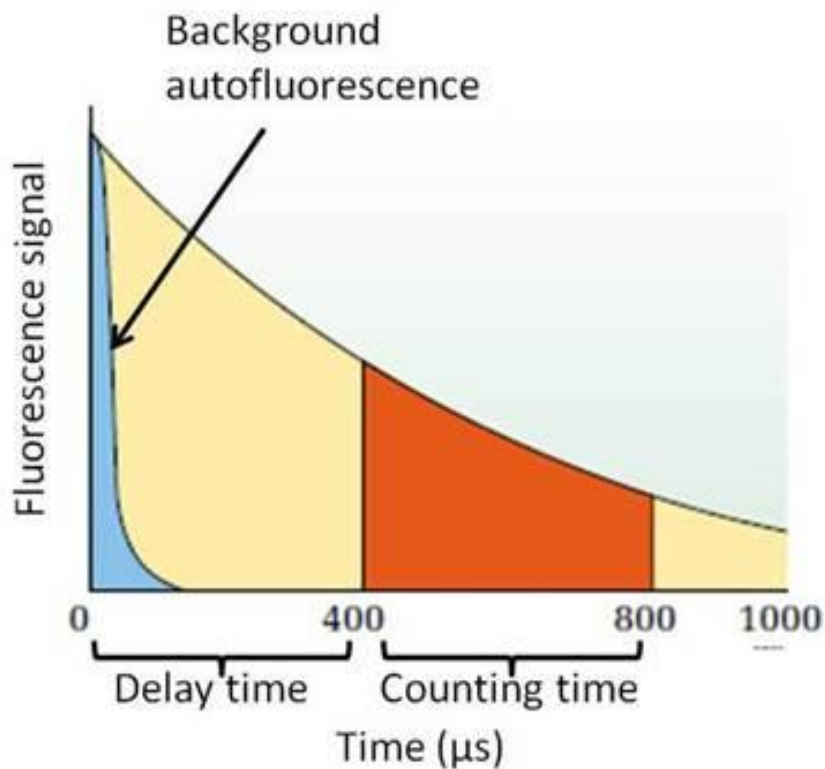
### 5.1 Aikaerotteinen luminesenssi

Luminesenssiin perustuvat havainnointitekniikat ovat yleisiä biologisissa analyyseissä, sillä luminesenssiin perustuvilla tekniikoilla on korkea herkkyys. Luminesenssiksi kutsutaan valon emissiota, jota syntyy kun molekyylin viritystila purkautuu. Fotoluminesenssi voidaan jakaa fluoresenssiin ja fosforesenssiin, joista fluoresenssi on nopeampi prosessi. Kun atomeihin ja molekyyliin kohdistetaan viritysvaleta tietyllä aallonpituudella, ne emittoivat jonkin aikaa pidemmällä aallonpituudella. Tätä aikaväliä kutsutaan fluoresenssin eliniäksi, ja se kestää yleensä alle 10 ns. Energiaeroa emission ja virityksen välillä kutsutaan Stokesin siirtymäksi (kuva 12) (Jacobino 2011; Song & Quirk 2012; Högmänder 2013).



Kuva 12 Stokesin siirtymä

Aikaerotteisen luminesenssin avulla päästään eroon taustaluminesenssista, joka muuten häiritsisi varsinaista mittausta. Taustaluminesenssia aiheuttavat monet luonnostaan fluoresoivat biologiset yhdisteet. Aikaerotteisessa luminesenssin mittauksessa fluoresoivat molekyylit saadaan virittymään virityspulssilla, ja vasta lyhyen viiveen jälkeen mitataan emissio (kuva 13). Näin saadaan taustasignaali laskemaan ennen emission mittaamista (Jacobino 2011; Högmander 2013).



Kuva 13 Aikaerotteinen fluorometria (PerkinElmer 2015)

Lantanidikelaatit ovat hyviä luminoforeja, sillä niillä on pitkäikäinen emissio ja kapeat emissiopiikit. Lisäksi niillä on suuri Stokesin siirtymä. Lantanidikelaattien emission puoliintumisaika on pitkä verrattaessa perinteisiin fluoroforeihin. (Jacobino 2011).

## 5.2 Muut tekniikat

PerkinElmerillä on kaupallinen LANCE-tekniikka, joka perustuu europiumin käyttöön TR-FRET (*Time resolution with fluorescence resonance energy transfer*) –määrittelyssä. Tekniikassa käytetään luovuttaja- sekä vastaanottajafluorofolileimoja. Kun kaksi fluoroforia tuodaan yhteen, energiaa siirretään luovuttajalta vastaanottajalle. Luovuttajafluoroforin eksitaatio päättyy vastaanottajafluoroforin emissioon kun fluoroforit ovat lähellä toisiaan (9 nm tai vähemmän) (PerkinElmer 2015).

Myös muita erilaisia menetelmiä entsyymiaktiivisuuden mittaamiseen löytyy. Kinaasinmääritysmenetelmiä löytyy mm. DiscoverX:tä. R&D Systemsiltä sekä Promegalta. DiscoverX:n menetelmä, KINOMEScan, on kilpaileva määrittäminen, joka perustuu määrittämisessä käytettäviin yhdisteisiin, jotka sitoutuvat kinaasiin ja estävät näin kinaasin sitoutumista ligandiin. Mittaukset tehdään qPCR:llä, ja siinä mitataan kontrollinäytteen määrää verrattuna kinaasin määrään. R&D Systemsillä oleva kinaasiaktiivisuustesti perustuu fosforylaatiossa tapahtuvaan ADP:n muodostumiseen. Suurin osa kinaaseista saa fosfaattiryhmänsä ATP:ltä muuttaen luovuttajamolekyylin ADP:ksi. Määrittämisessä ADP:lta irrotetaan fosfaatti, jonka määrää mitataan reaktiossa, sillä irronneen fosfaatin määrä korreloi fosforylaatiossa muodostuvan ADP:n kanssa. Promegan määrittäsmenetelmä puolestaan mittaa kinaasiaktiivisuutta liuoksessa jäljellä olevan ATP:n avulla (Promega 2015; R&D Systems 2016; DiscoverX 2016).

## 6 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Opinnäytetyössä tutkittiin ja kehitettiin kinaasimääritysmenetelmää lääkeaineiden tehoseulontaan. Menetelmä perustuu fluoresenssin käyttöön mikrotiitterilevyformaattissa. Määrityksissä laskettiin signaalin ja taustan välinen suhde, jonka tuli olla vähintään 3, jotta määrittäminen olisi kannattava tehdä. Määrityksissä tehtiin vähintään kolme rinnakkaista määrittäystä, joista laskettiin keskiarvo ja variaatio (CV-prosentti).

Käytetyt liuokset valmistettiin PKA-puskuriin (HEPES, EDTA, Triton, NaCl, pH 7,5). Määritykset suoritettiin aluksi 50 µl:n tilavuudessa, jolloin selvitetään määrittäykseen sopivat pitoisuudet. Kun todettiin menetelmien toimivan, siirryttiin 10 µl:n tilavuuteen, joka on taloudellisempi ratkaisu.

Mittaukset tehtiin Labroxin levylukijalla käyttäen 600 µs viivästysaikaa ja 25 leimahdusta aallonpituuksilla 615 nm (emissio) ja 340 nm (eksitaatio). Käytetyt kuoppalevyt olivat mustia mikrotiitterilevyjä (Optiplat 284F, PerkinElmer).

Sammutinmolekyyli (Quench III) saatiin QRET Technologies Oy:ltä (Turku). Peptidit hankittiin Pepmic Co:lta ja inhibiittorit Santa Cruz Biotechnologiesilta.

Ennen varsinaisen reaktion suoritusta tehtiin sitoutumistestejä, joissa sidottiin leusiinivetoketjurakenteeseen europium-leimattu peptidi sekä peptidisubstraatti. Tämä tehtiin, jotta saatiin selvitettyä parhaat konsentraatiot mahdollisimman suuren signaalitaustasuhteen saamiseksi.

### 6.1 Eu-peptidin leimaus

Määrityksissä käytettiin aiemmin valmistettua Eu-leimattua peptidiä. Europium-kelaatti konjugoitiin peptidiin sekoittaen huoneenlämmössä yön yli valolta suojattuna. Eu-leimattu peptidi puhdistettiin tämän jälkeen HPLC-laitteella, josta kerättiin fraktiot talteen. Leimatut fraktiot tarkistettiin UV-valon avulla, jonka jälkeen fraktiot kuivattiin ja pakastettiin. Eu-peptidin pitoisuus määritettiin fluoresenssimittauksen avulla.



Eu-peptidin sekvenssi on muunneltu artikkelista *Increasing the affinity of selective bZIP-binding peptides through surface residue redesign* (Kaplan ym. 2014).

## 6.2 Peptidisubstraatin valinta

Peptidisubstraatin valinta tehtiin kirjallisuuden perusteella. Vaihtoehtoina oli kaksi lähes saman aminohapposekvenssin omaavaa fosforyloitua peptidiä, pMO5 ja Pep2. Erona peptideissä on se, että pMO5:lla ei ole konsensussekvenssiä fosfataasille. Pep2-peptidillä puolestaan on fosfotyrosiinin lähellä aminohapot, jotka auttavat entsyymiä tunnistamaan defosforyloitavan kohdan.

Testattiin fosforyloimattomien peptidien MO5 ja Pep3 sitoutumista europium-leimattuun peptidiin eri konsentraatioissa. Peptidisubstraattien konsentraatiot olivat 1 nM, 10 nM, 100 nM ja 1  $\mu$ M. Europium-leimatun peptidin konsentraatio oli 10 nM. Sammuttimen konsentraatio määrittäksessä oli 3,3  $\mu$ M.

Määrittäminen suoritettiin 50  $\mu$ l:n tilavuudessa. Liuokset valmistettiin PKA-puskuriin. Ensin kaivoihin pipetoitiin 10  $\mu$ l peptidisubstraattia ja 20  $\mu$ l Eu-leimattua peptidiä. Kuoppalevyjä inkuboitiin huoneenlämmössä levysekoittajassa 10 minuutin ajan, jonka jälkeen mitattiin aikaerotteinen luminesenssisignaali, jotta nähtäisiin europiumin signaaleiden olevan kyseiselle konsentraatiolle normaalilla tasolla. Tämän jälkeen pipetoitiin 20  $\mu$ l liukoista sammutinta liuokseen, inkuboitiin samoissa olosuhteissa 5 minuutin ajan, ja mitattiin uudelleen signaalit. Tarkoituksena oli nähdä, kuinka korkeat signaalit peptidit tuottavat, jotta osattiin valita oikea peptidi käytettäväksi myöhemmissä määrittäksissä.

Tehtiin myös määrittäminen, jossa erikseen sidottiin fosforyloitu peptidi ja fosforyloimaton peptidi europium-leimattuun peptidiin, jotta saataisiin laskettua signaalin ja taustan suhde. Pelkän sitoutumistestin lisäksi testattiin peptidejä reaktiossa, jossa käytettiin 3 nM PTP1B-entsyymiä sekä 10  $\mu$ M  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  -inhibiittoria. Peptidien konsentraatiot tässä määrittäksessä olivat 10 nM, Eu-leimatun peptidin 5 nM ja sammuttimen 3,5  $\mu$ M.

Määrittäminen suoritettiin 50 µl:n tilavuudessa. Valmistettiin reaktioliuokset erikseen, joista pipetoitiin 10 µl kuoppiin. Kontrollireaktiossa oli 5 µl peptidisubstraattia (pMO5 tai Pep2), 1 µl puskuria ja 4 µl entsyymiä. Inhiboidussa reaktiossa oli 5 µl peptidisubstraattia, 1 µl inhibiittoria sekä 4 µl entsyymiä. Sitoutumistestissä entsyymien ja inhibiittorin tilalla käytettiin PKA-puskuria. Taustana oli fosforyloitu peptidi ja suuret signaalit mitattiin fosforyloimattoman peptidin sitoutumisesta Eu-leimattuun peptidiin. Pipetoinnin jälkeen inkuboitiin huoneenlämmössä levysekoittajalla 45 minuuttia. Lisättiin 20 µl Eu-leimattua peptidiä, inkuboitiin samoissa olosuhteissa 5 minuutin ajan, ja mitattiin aikaerotteista fluoresenssia. Mittauksen jälkeen lisättiin 20 µl liukoista sammutinta, inkuboitiin 8 minuuttia ja mitattiin uudelleen signaalit. Signaalit mitattiin myös 20 minuutin inkuboinnin jälkeen. Signaalin ja taustan suhde saatiin laskettua jakamalla peptidien signaalit vastaavien, fosforyloitujen peptidien signaaleilla.

### 6.3 Peptidikonsentraation valinta

Peptidisubstraatin valitsemisen jälkeen määritettiin oikeanlaiset konsentraatiot peptidisubstraatille ja Eu-leimatulle peptidille. Signaalin ja taustan suhde haluttiin mahdollisimman suureksi mahdollisimman pienillä konsentraatioilla. Testattiin sitoutumistestissä peptidisubstraattikonsentraatioita 5 nM, 10 nM ja 20 nM. Eu-leimatun peptidin konsentraatiot olivat 5 nM ja 10 nM. Aikaisempien määrittäysten perusteella valittiin sammuttimen konsentraatioiksi 2,5 µM, kun Eu-leimatun peptidin konsentraatio oli 5 nM, ja 3,3 µM Eu-leimatun peptidikonsentraation ollessa 10 nM.

Taulukko 1 Peptidikonsentraation valinta

Peptidisubstraatti	Eu-peptidi	Signaali (ka.)	CV%	S/B
MO5 (5 nM)	5 nM	1066	20	24,8
MO5 (5 nM)	10 nM	1070	19	19,0
pMO5 (5 nM)	5 nM	43	22	
pMO5 (5 nM)	10 nM	56	7	
MO5 (10 nM)	5 nM	3505	5	16,61
MO5 (10 nM)	10 nM	3639	7	18,63
pMO5 (10 nM)	5 nM	211	9	
pMO5 (10 nM)	10 nM	195	3	
MO5 (20 nM)	5 nM	5067	4	8,03
MO5 (20 nM)	10 nM	7587	4	12,43
pMO5 (20 nM)	5 nM	631	11	
pMO5 (20 nM)	10 nM	610	8	

Määrittäminen suoritettiin 50 µl:n tilavuudessa. Ensin kuoppiin pipetoitiin 10 µl peptidisubstraattia ja 20 µl Eu-leimattua peptidiä. Inkuboitiin 5 minuutin ajan levysekoittajassa huoneenlämmössä, jonka jälkeen mitattiin aikaerotteista luminesenssia. Lisättiin 20 µl sammutinta, inkuboitiin samoissa olosuhteissa 8 minuutin ajan ja mitattiin aikaerotteinen fluoresenssi.

#### 6.4 Entsyymikonsentraation valinta

Paria eri entsyymikonsentraatiota testattiin eri peptidikonsentraatioiden kanssa. Jo aiemmin oltiin todettu määrittämissä, että 3 nM fosfataasientsyymiä on riittävä määrä defosforyloimaan 10 nM peptidisubstraattia. Testattiin entsyymikonsentraatioita 3 nM ja 1 nM peptidisubstraattikonsentraatioiden 10 nM ja 5 nM kanssa. Inhibiittorina määrittäksessä käytettiin natrium-ortovanadaattia ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) ja sen konsentraatio määrittäksessä oli 3 µM, Eu-leimatun peptidin konsentraatio oli 5 nM ja sammuttimen konsentraatio oli 1,2 µM.

Määritys suoritettiin 10 µl:n tilavuudessa. Pipetoitiin 1 µl inhibiittoria tai puskuria kuoppiin. Pipetoitiin 4 µl entsyymiä ja annettiin sekoittua levysekoittajalla yhden minuutin ajan. 1 µl peptidisubstraattia ja 1 µl Eu-leimattua peptidiä pipetoitiin kaivoihin. Inkuboitiin huoneenlämmössä 45 minuutin ajan, jonka jälkeen mitattiin aikaerotteinen luminesenssi. Lisättiin 3 µl sammutinta, inkuboitiin samoissa olosuhteissa 15 minuuttia ja mitattiin taas aikaerotteinen fluoresenssi.

## 6.5 Kinetiikka

Entsyymien kinetiikkaa seurattiin 60 minuutin ajan. Reaktio tehtiin 20 µl:n tilavuudessa kahden eri entsyymikonsentraation (3 nM ja 1 nM) avulla. Inhibiittorina kinetiikkamäärityksessä käytettiin 3 µM natriumortovanadaattia ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ). Peptidisubstraattikonsentraatio oli 10 nM ja Eu-leimatun peptidin konsentraatio 5 nM. Sammuttimen konsentraatio 3 nM entsyymille oli 2,5 µM ja 1 nM entsyymille 2,0 µM.

Ensin pipetoitiin mikrotiitterilevyille 5 µl Eu-leimattua peptidiä ja inkuboitiin huoneenlämmössä levysekoittajalla kolmen minuutin ajan. Mitattiin fluoresenssi. Lisättiin 1 µl inhibiittoria kahteen reaktikuoppaan ja 1 µl PKA-puskuria kontrollikuoppiin, jonka jälkeen inkuboitiin samoissa olosuhteissa viiden minuutin ajan. Mitattiin taas fluoresenssi. Lisättiin 5 µl sammutinta jokaiseen kuoppaan ja inkuboitiin viiden minuutin ajan, jonka jälkeen mitattiin uudelleen fluoresenssi. Pipetoitiin 5 µl fosforyloitua peptidiä pMO5 reaktikuoppiin sekä 5 µl fosforyloimatonta peptidiä MO5 yhteen kontrollikuoppaan. Inkuboitiin jälleen viisi minuuttia ja mitattiin fluoresenssi. Tämän jälkeen pipetoitiin kuoppiin vielä 4 µl PTP1B-entsyymiä ja mitattiin fluoresenssia tästä hetkestä 20 minuuttia minuutin välein. 20 minuutin jälkeen fluoresenssi mitattiin viiden minuutin välein aina 60 minuuttiin saakka, jonka jälkeen signaalit alkoivat laskea.

## 6.6 Inhibiittorititraus

Inhibiittorititrauksen tarkoituksena oli testata eri inhibiittorikonsentraatioita, jotta nähdään, mikä on kyseisen inhibiittorin  $IC_{50}$  -arvo, eli se inhibiittorikonsentraatio, jossa inhibiittori inhiboi puolet reaktiosta. Testattiin kahta eri PTP1B:tä inhiboivaa inhibiittoria, natriumortovanadaattia ( $Na_3VO_4$ ) ja TCS-401:ta. Titraus tehtiin 10  $\mu$ l:n tilavuudessa monella eri inhibiittorikonsentraatiolla. Peptidisubstraattikonsentraatio sekä Eu-leimatun peptidin konsentraatio oli 10 nM. Entsyymikonsentraatio oli määrittämissä 3 nM. Sammuttimen konsentraatio oli 3,3  $\mu$ M. Ensin pipetoitiin 1  $\mu$ l inhibiittoria kuopan pohjalle. 1  $\mu$ l peptidisubstraattia, 1  $\mu$ l Eu-leimattua peptidiä ja 3  $\mu$ l sammutinta sekoitettiin toisiinsa, ja sekoituksesta pipetoitiin 5  $\mu$ l seosta jokaiseen kuoppaan, jonka jälkeen inkuboitiin huoneenlämmössä levysekoittajassa viiden minuutin ajan, jotta reagenssit sekoittuvat toisiinsa. Mitattiin aikaerotteinen luminesenssi, jonka jälkeen lisättiin 4  $\mu$ l entsyymiä. Inkuboitiin huoneenlämmössä viiden minuutin ajan, jonka jälkeen mitattiin aikaerotteinen luminesenssi.

## 6.7 Samanaikaiset määritykset

Tehtiin kahdenlaisia kaksoismäärittäyksiä samassa kuopassa. Toisessa määrittäyksessä kuopassa oli kaksi eri kinaasientsyymiä sekä kummallekin entsyymille oma spesifinen inhibiittorinsa sekä oma peptidisubstraatti. Lisäksi testattiin kummallekin kinaasientsyymille sopivaa universaalista inhibiittoria, staurosporiniä.

Toisessa määrittäyksessä tehtiin samassa kuopassa sekä fosforylaatio että defosforylaatio. Määrittäys tehtiin kumminkin päin; ensin fosforylaatio ja sitten defosforylaatio sekä niin, että ensin tehtiin defosforylaatio ja sen jälkeen fosforylaatio.

### PKA/EGFR

Määrittäyksen tavoitteena oli löytää inhibiittori, joka estää kummankin kinaasientsyymien toimintaa. Määrittäyksessä kummallakin entsyymillä oli oma substraattin-

sa sekä spesifinen inhibiittori. Lisäksi määrittäksessä oli mukana myös kummankin entsyymin toimintaa estävä universaali inhibiittori.

Toisessa reaktiossa oli 1 nM EGFR-kinaasia. Peptidisubstraattina EGFR-entsyymille käytettiin 7,5 nM MO5-peptidiä, inhibiittorina tälle kinaasille käytettiin 2 µM AG-1478-inhibiittoria.

Toisessa reaktiossa entsyyminä oli 0,5 nM PKA-kinaasia, jota valittiin estämään 2 µM H-89-inhibiittori. Peptidisubstraattina käytettiin P8g-peptidiä.

Lisäksi reaktiossa käytettiin 3 µM kummankin entsyymin toimintaa estävää universaalia inhibiittoria nimeltä staurosporiini. Kummallekin peptidisubstraatille siirrettiin fosfaattiryhmä ATP:ltä, jota oli reaktiossa 50 µM. Kumpikin peptidisubstraatti sidottiin 10 nM:iin europium-leimattua peptidiä. Lisäksi kontrollissa käytettiin 15 nM fosforyloitua peptidisubstraattia pMO5.

Reaktio tehtiin 50 µl:n tilavuudessa.

Kaksoismäärittäksessä, jossa tehtiin kaksi peräkkäistä reaktiota, seurattiin ainoastaan jälkimmäistä reaktiota ja verrattiin saatua signaalin ja taustan suhdetta niihin määrittäksiin, joissa tehtiin yksi reaktio kerrallaan. Kaksoismäärittäys tehtiin kumminkin päin. Ennen kaksoismäärittäystä tuli selvittää yksittäisreaktioiden avulla sopiva entsyymikonsetraatio. Peptidisubstraattia päätettiin käyttää 20 nM.

Ensin tehtiin määrittäys, jossa ensin tehtiin fosforylaatio ja sen jälkeen defosforylaatio. Pipetoitiin 3 µl peptidisubstraattia MO5 ja pMO5, 3 µl ATP:tä, 1 µl PKA-puskuria sekä 3 µl EGFR-entsyymiä eli yhteensä 10 µl reaktioseosta kuoppaan ja inkuboitiin 30 minuutin ajan huoneenlämmössä levysekoittajassa. Lisättiin 1 µl PKA-puskuria tai inhibiittoria AG-1478 pysäyttämään fosforylaatioreaktio. Tämän jälkeen kuoppiin lisättiin 4 µl PTP1B-entsyymiä sekä 1 µl puskuria tai inhibiittoria  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  ja inkuboitiin 45 minuuttia huoneenlämmössä levysekoittajalla. Inkuboinnin jälkeen lisättiin 20 µl Eu-leimattua peptidiä ja inkuboitiin 5 minuutin ajan, jonka jälkeen mitattiin aikaerotteista fluoresenssia. Lisättiin 15 µl sammutinta, inkuboitiin 8 minuutin ajan ja mitattiin uudelleen signaalit.

Taulukko 2 EGFR/PTP1B-pipetointitaulukko

<b>Peptidisubstraatti</b>	<b>Eu-peptidi</b>	<b>EGFR-inhibiittori</b>	<b>EGFR</b>	<b>PTP1B</b>	<b>PTP1B-inhibiittori</b>
<b>MO5 (20 nM)</b>	10 nM	2 µM	0,5 nM	5 nM	-
<b>MO5 (20 nM)</b>	10 nM	2 µM	0,5 nM	5 nM	10 µM
<b>MO5 (20 nM)</b>	10 nM	2 µM	1 nM	5 nM	-
<b>MO5 (20 nM)</b>	10 nM	2 µM	1 nM	5 nM	10 µM
<b>pMO5 (20 nM)</b>	10 nM	-	1 nM	5 nM	-
<b>pMO5 (20 nM)</b>	10 nM	-	1 nM	5 nM	10 µM
<b>MO5 (10 nM)</b>	5 nM	2 µM	0,5 nM	5 nM	-
<b>MO5 (10 nM)</b>	5 nM	2 µM	0,5 nM	5 nM	10 µM
<b>MO5 (10 nM)</b>	5 nM	2 µM	1 nM	5 nM	-
<b>MO5 (10 nM)</b>	5 nM	2 µM	1 nM	5 nM	10 µM
<b>pMO5 (10 nM)</b>	5 nM	-	1 nM	5 nM	-
<b>pMO5 (10 nM)</b>	5 nM	-	1 nM	5 nM	10 µM

Määrittäksessä seurattiin defosforylaatiota. Mittaukset tehtiin viimeisen reaktion jälkeen, ja saaduista signaaleista laskettiin signaalin ja taustan suhde.

Seuraavaksi tehtiin määrittäminen, jossa tehtiin ensin defosforylaatioreaktio ja sen jälkeen vasta fosforylaatioreaktio. Pipetoitiin 3 µl peptidisubstraattia, 4 µl puskuria sekä 3 µl PTP1B-entsyymiä, eli yhteensä 10 µl:n reaktioseos kuoppiin. Inkuboitiin huoneenlämmössä sekoituksessa 30 minuutin ajan. Lisättiin 1 µl  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ -inhibiittoria pysäyttämään defosforylaatioreaktio ja inkuboitiin 7 minuutin ajan. Lisättiin kuoppiin 2 µl EGFR-entsyymiä, 2 µl ATP:ta sekä 1 µl inhibiittoria (tai puskuria) ja inkuboitiin samoissa olosuhteissa 45 minuutin ajan. Lisättiin 20 µl Eu-leimattua peptidiä ja inkuboitiin 5 minuutin ajan, jonka jälkeen mitattiin signaalit. Tämän jälkeen pipetoitiin jokaiseen kaivoon 15 µl sammutinta, inkuboitiin 8 minuutin ajan ja mitattiin signaalit.

Taulukko 3 PTP1B/EGFR -pipetointitaulukko

<b>Peptidisubstraatti</b>	<b>Eu-peptidi</b>	<b>PTP1B-inhibiittori</b>	<b>PTP1B</b>	<b>EGFR</b>	<b>EGFR-inhibiittori</b>
<b>pMO5 (20 nM)</b>	10 nM	10 µM	3 nM	0,5 nM	-
<b>pMO5 (20 nM)</b>	10 nM	10 µM	3 nM	0,5 nM	2 µM
<b>MO5 (20 nM)</b>	10 nM	10 µM	3 nM	0,5 nM	-
<b>MO5 (20 nM)</b>	10 nM	10 µM	3 nM	0,5 nM	2 µM
<b>pMO5 (10 nM)</b>	5 nM	10 µM	3 nM	0,5 nM	-
<b>pMO5 (10 nM)</b>	5 nM	10 µM	3 nM	0,5 nM	2 µM
<b>MO5 (10 nM)</b>	5 nM	10 µM	3 nM	0,5 nM	-
<b>MO5 (10 nM)</b>	5 nM	10 µM	3 nM	0,5 nM	2 µM

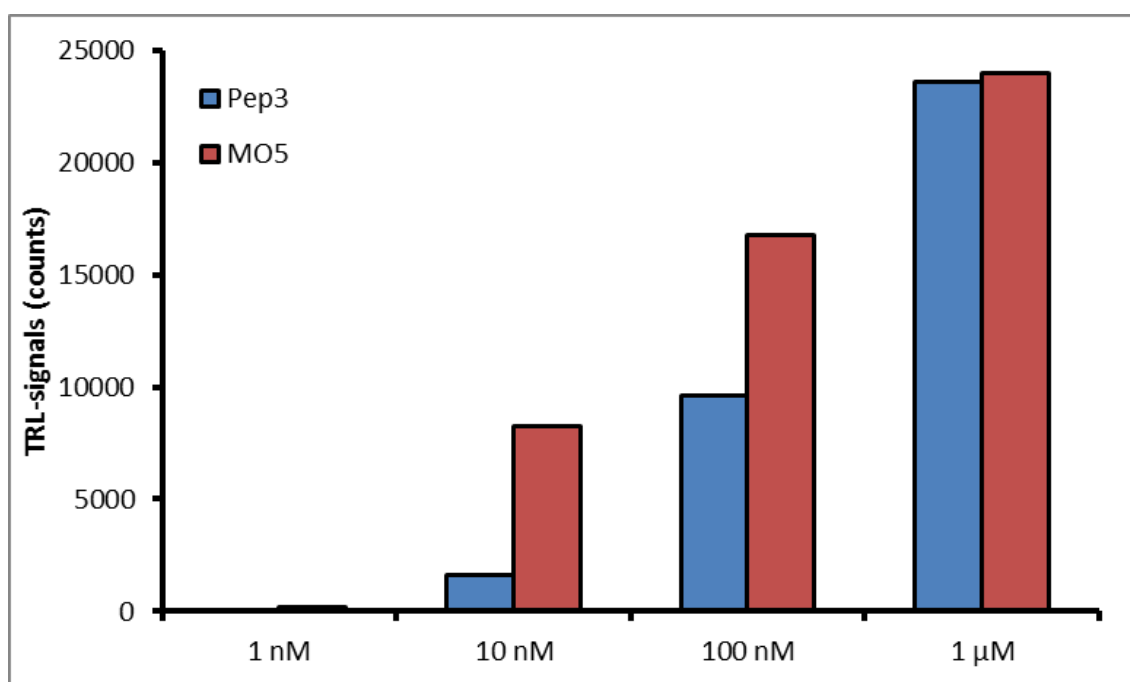
Määrittämisessä seurattiin fosforylaatioreaktiota. Mittausten jälkeen verrattiin signaalia ja taustaa toisiinsa.



## 7 TULOKSET

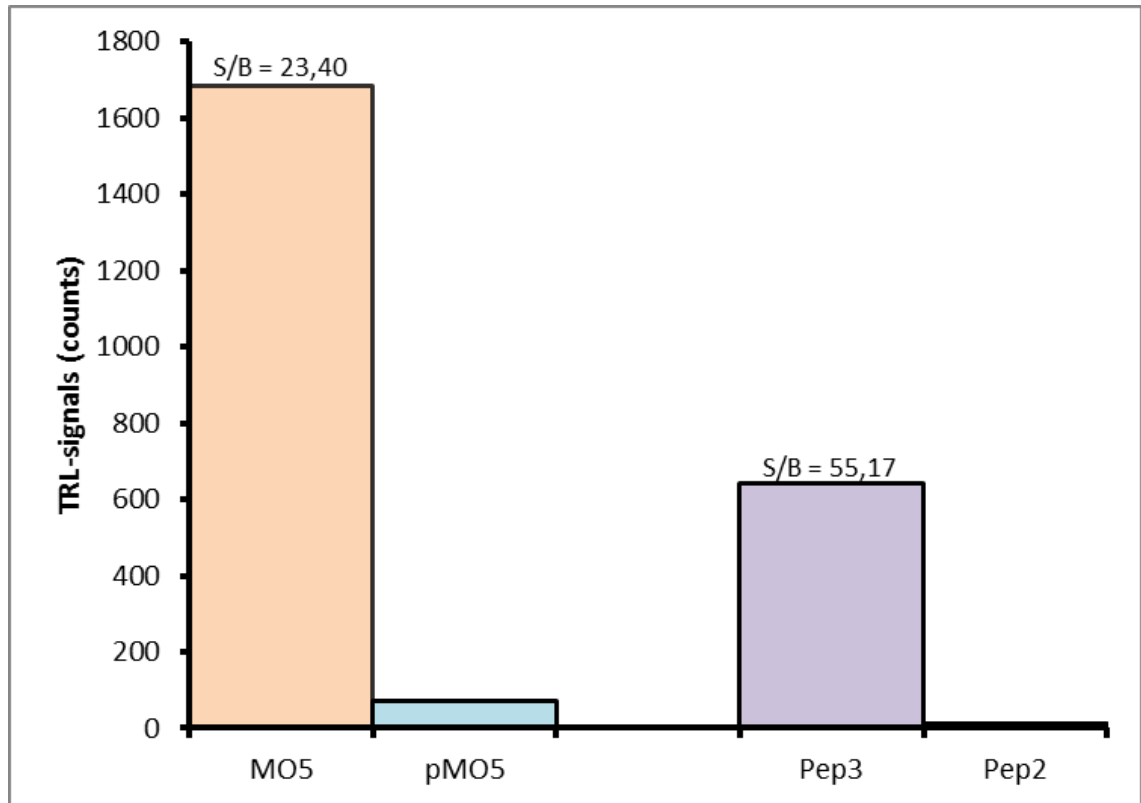
### 7.1 Peptidisubstraatin valinta

Peptidisubstraattia valittaessa testattiin kahden eri peptidin signaaleja toisiinsa. Peptideitä ei oltu fosforyloitu. Peptidejä testattiin neljällä eri konsentraatiolla; 1 nM, 10 nM, 100 nM ja 1  $\mu$ M. Huomattiin, että peptidi MO5 antoi korkeammat signaalit kuin Pep3 (kuvio 1).



Kuvio 1 Peptidisubstraatin valinta

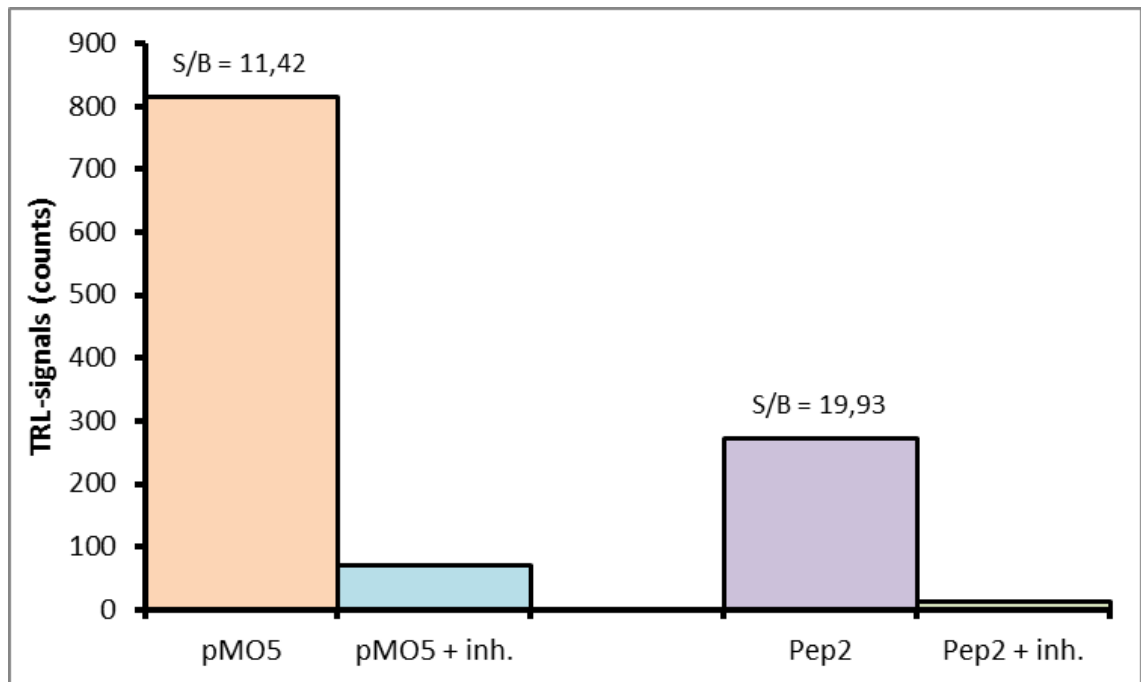
Tämän jälkeen testattiin kumpaakin peptidiä sitoutumistestissä fosforyloidun peptidin kanssa. Peptidisubstraatin määräksi valittiin edellisen määrittelyn perusteella 10 nM, sillä se antaa riittävän suuren signaalin. Peptidisubstraatti sidottiin leusiinivetoketjulla europium-leimattuun peptidiin, jonka konsentraatio määrittelyssä oli 5 nM.



Kuvio 2 Peptidien sitoutumistesti

Pep3/Pep2 –peptidipari (kuvio 2) antoi huomattavasti suuremman signaalin ja taustan suhteen. Signaalit itsessään olivat kuitenkin huomattavasti pienempiä, mikä vaikuttaa suureen signaalin ja taustan suhteeseen.

Testattiin kumpaakin fosforyloitua peptidiä vielä varsinaisessa defosforylaatio-reaktiossa, jossa mukana olivat myös 3 nM entsyymiä PTP1B ja 10  $\mu$ M inhibiittoria  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ .

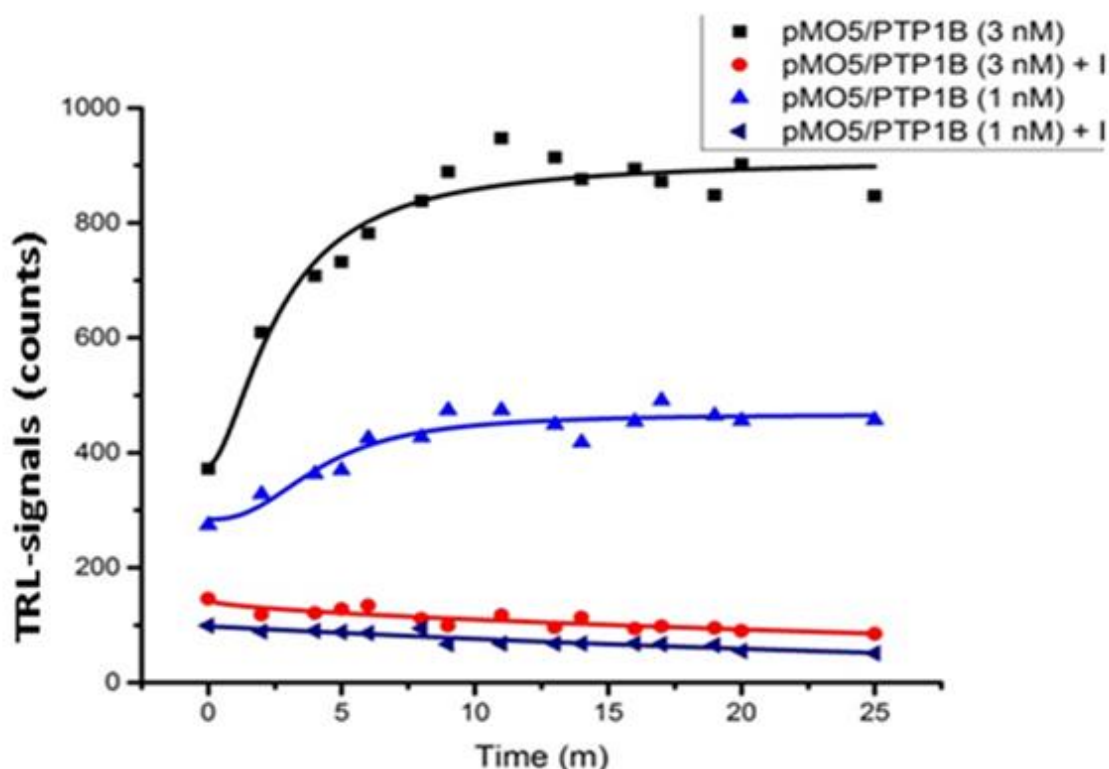


Kuvio 3 Peptidisubstraatin valinta

Edelleen nähdään, että Pep2-peptidi tuottaa korkeamman signaalin ja taustan suhteen reaktiossa mutta signaalit ovat hyvin pienet (kuvio 3). pMO5 toimii reaktiossa kuitenkin hyvin ( $S/B > 3$ ), ja koska se tuottaa suuremmat signaalit, päädyttiin valitsemaan pMO5-peptidi seuraaviin määrittäisiin.

## 7.2 Kinetiikka

Kinetiikkamittaus tehtiin, jotta saatiin selville fosfataasientsyymin PTP1B aktiivisuus. Mittausta suoritettiin 90 minuuttiin asti niin, että ensin mitattiin mahdollisimman usein 20 minuuttiin asti, jonka jälkeen mitattiin 5 minuutin välein 60 minuuttiin asti ja loput 30 minuuttia mitattiin 10 minuutin välein.

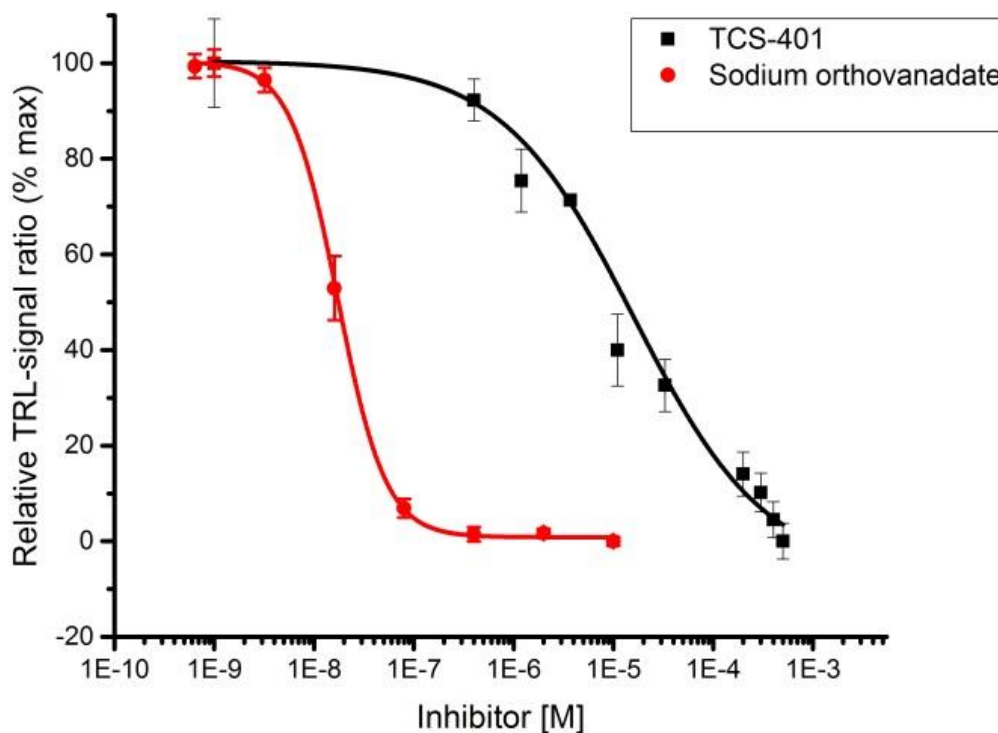


Kuvio 4 Kinetiikkakuvaaja

Kuvaajasta (kuvio 4) nähdään, että entsyymillä kestää alle kymmenen minuuttia saavuttaakseen korkeimman aktiivisuuden. Inhibiittorin kanssa suorat ovat tasaiset ja laskevat loivasti. Entsyymin konsentraatiosta huolimatta suorat ovat samanlaiset. Korkeampi entsyymipitoisuus tuottaa korkeammat signaalit mutta signaalit ovat kuitenkin hyvin samankaltaiset.

### 7.3 Inhibiittorititraus

Inhibiittorit testattiin ensin sitoutumistestissä, jotta saatiin varmistettua, ettei inhibiittori häiritse normaalia sitoutumista. Tämän jälkeen tehtiin inhibiittorititraus, jolla selvitettiin inhibiittorin  $IC_{50}$ -arvo, eli konsentraatio, jossa inhibiittori estää puolet reaktiosta. Inhibiittorititraus tehtiin usealla eri inhibiittorikonsentraatiolla.



Kuvio 5 Inhibiittorikuvaaja

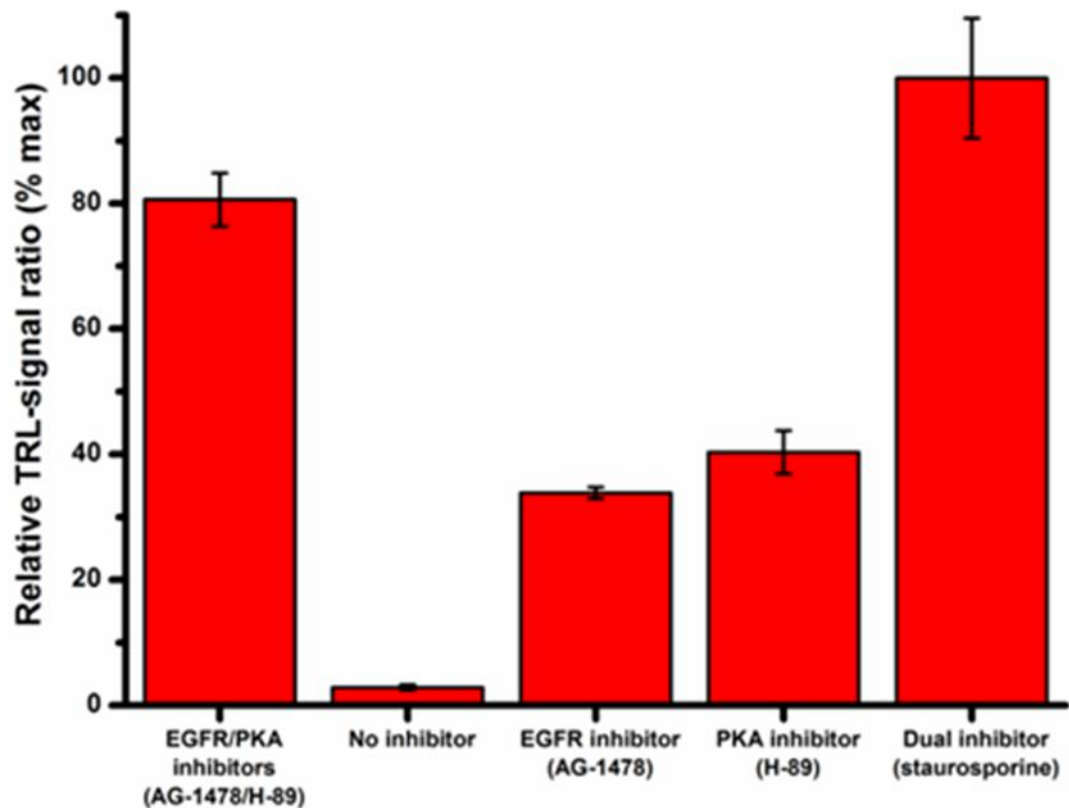
Inhibiittorin TCS-401  $IC_{50}$ -arvoksi saatiin 15,5  $\mu$ M. Inhibiittorin  $Na_3VO_4$   $IC_{50}$ -arvoksi saatiin 17,5 nM.

#### 7.4 Kaksoismääritykset

Kaksoismäärityksiä tehtiin kaksi. Toisessa oli kaksi kinaasientsyymiä omine peptidisubstraatteineen sekä spesifisine inhibiittoreineen. Mukana oli myös universaali inhibiittori. Toisessa kaksoismäärityksessä tehtiin fosforylaatio ja defosforylaatio peräkkäin samassa kuopassa.

Kahden kinaasientsyymin yhteismäärityksessä kaikissa kuopissa oli kumpaakin entsyymiä ja kumpaakin peptidisubstraattia (kuvio 6). Inhibiittori vaihteli eri kuoppien välillä. Yhdessä oli kumpaakin spesifistä inhibiittoria. Yhdessä oli inhibiittori vain EGFR-entsyymille ja toisessa vain PKA-entsyymille. Lisäksi oli myös

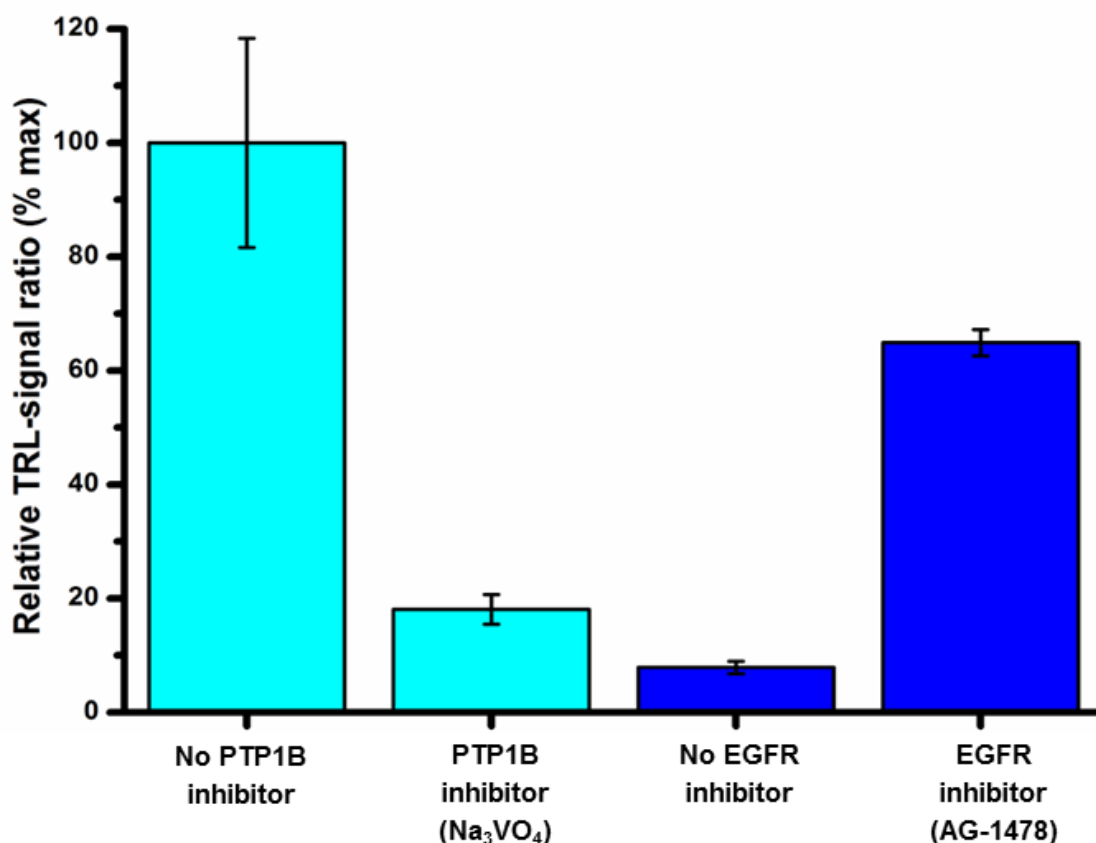
tilanne, jossa oli universaalia inhibiittoria sekä tilanne, jossa inhibiittoria ei ollut laisinkaan.



Kuvio 6 EGFR/PKA -kuvaaja

Kuvaajasta nähdään saatujen signaaleiden suhde toisiinsa nähden. Ensimmäisessä pylväässä on kummallekin entsyymille spesifinen inhibiittori. Viimeisessä pylväässä on puolestaan universaali inhibiittori. Universaali inhibiittori antaa suuremman signaalin kuin kaksi spesifistä inhibiittoria yhdessä. Spesifiset inhibiittorit puolestaan yksin reaktiossa antavat suunnilleen samansuuruisen signaalin. Ilman inhibiittoria signaali on hyvin pieni.

Tehtiin määrittys, jossa vastareaktiot tehtiin peräkkäin. Seurattiin jälkimmäistä reaktiota, jotta nähtiin reaktion toimivan kuten yksittäisessä määityksessä ilman toista reaktiota.



Kuvio 7 PTP1B/EGFR -kuvaaja

EGFR fosforyloi peptidisubstraatin, jonka jälkeen PTP1B defosforyloi sen. Reaktioiden jälkeen PTP1B-entsyymin aktiivisuus mitattiin, ja nämä tulokset näkyvät kuvaajassa vaaleansinisinä (kuvio 7). Kun reaktio tehdään toisinpäin, ja fosfosubstraatti ensin defosforyloidaan PTP1B-entsyymillä ja sen jälkeen fosforyloidaan EGFR-entsyymillä, ja mitataan vain jälkimmäisen reaktion signaalit, saadaan tulokset, jotka näkyvät kuvaajassa tummansinisinä.

## 8 TULOSTEN TARKASTELU

Tässä osiossa perehdytään saatuihin tuloksiin tarkemmin.

Työ aloitettiin sopivan peptidisubstraatin valinnasta. Valittiin korkeampien signaalien perusteella MO5/pMO5 –peptidipari. Peptidit toimivat eri määrittelyissä hyvin. Kaksoismäärittelyissä, joissa tehtiin kaksi fosforylaatioreaktiota, käytettiin myös peptidisubstraattia P8g PKA-entsyymien kanssa, joka sekin toimi hyvin.

Entsyymi- ja peptidikonsentraatioita tutkittiin muutamassa määrittelyssä tekemällä määrittely parilla eri konsentraatiolla, esimerkkinä kinetiikkamittauksissa käytettiin kahta entsyymikonsentraatiota. Kinetiikkamittauksessa nähtiin entsyymiaktiivisuuden saavuttavan huippunsa hieman alle kymmenen minuutin mutta aktiivisuus ei kuitenkaan lähtenyt laskuun tunnin sisällä. Näin ollen voidaan todeta, että 45 minuutin inkubointiaika on sopiva defosforylaatioreaktiolle.

Inhibiittorititrauksessa haluttiin selvittää kahden eri PTP1B-entsyymiä inhiboivan inhibiittorin  $IC_{50}$ -arvo, joka kertoo sen pitoisuuden, jolloin kyseinen inhibiittori pystyy estämään puolet reaktiosta.

Inhibiittorin TCS-401  $IC_{50}$ -arvoksi saatiin 15,5  $\mu$ M. Kirjallisuudessa inhibiittorin  $K_i$ -arvoksi annetaan 0,29  $\mu$ M. Vertailun vuoksi  $K_i$ -arvo tulisi muuttaa  $IC_{50}$ -arvoksi. Arvon laskemiseen tarvittaisiin se substraattikonsentraatio, jossa entsyymiaktiivisuus on puolet maksimista. Tätä varten tarvittaisiin peptidisubstraatin titraus, jota ei opinnäytetyön suorituksessa tehty.

$IC_{50}$ -arvo saadaan muutetuksi  $K_i$ -arvoksi kaavalla ’

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_m}}$$

ja tästä saadaan  $IC_{50}$ -arvo laskettua seuraavasti

$$IC_{50} = K_i \times \left(1 + \frac{[S]}{K_m}\right), josta$$



[S] = substraattikonsentraatio ja  $K_m$  = Michaelis-Mentenin vakio. Peptidisubstraatin konsentraatio oli 10 nM. Michaelis-Mentenin vakiota tässä tapauksessa ei tiedetä. Michaelis-Mentenin vakion kaava on seuraava:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

Michaelis-Mentenin vakiosta riippuen  $K_i$ -arvo verrattuna  $IC_{50}$ -arvoon on seuraavanlainen (Cer yms. 2009):

$$K_i = \frac{IC_{50}}{(S / K_m + 1)} \begin{cases} \text{if } S = K_m, & K_i = IC_{50} / 2 \\ \text{if } S \gg K_m, & K_i \ll IC_{50} \\ \text{if } S \ll K_m, & K_i \cong IC_{50} \end{cases}$$

Tästä voimme päätellä, että suurin mahdollinen lukuarvo  $K_i$ -arvolle on 15,5  $\mu$ M Michaelis-Mentenin vakion ollessa suurempi kuin substraattikonsentraatio.

Inhibiittorin TCS-401:n titrauksesta saatua tulosta ei näin ollen pystytä varmasti vertaamaan valmiisiin arvoihin.

Inhibiittorin  $Na_3VO_4$   $IC_{50}$ -arvoksi saatiin 17,5 nM. Kirjallisuuslähteistä saatu arvo on 53 nM, mikä on hieman suurempi kuin määrittämisessä saatu arvo, mutta samaa suuruusluokkaa kuitenkin (BioAssay Systems).

Taulukko 4 Inhibiittorien  $IC_{50}$ -arvot

Inhibiittori	S/B määrittämisessä	$IC_{50}$ määrittämisessä	$IC_{50}$ kirjallisuudessa
$Na_3VO_4$	7,6	17,5 nM	53 nM
TCS-401	9,1	15,5 $\mu$ M	-

Inhibiittorin TCS-401 titrauksessa käyrä näyttää vielä laskevan alaspäin sen sijaan, että se olisi jo saavuttanut pohjan. Inhibiittorititrauksessa olisi tullut siis käyttää vielä ainakin yhtä suurempaa inhibiittorikonsentraatiota. Inhibiittori oli

estänyt jo suurimman osan entsyymin toiminnasta mutta jotta voitaisiin olla varmoja, että kaikki entsyymin toiminta on estetty, suurempi inhibiittorikonsentraatio olisi varmistanut asian.

Kaksoismäärittelyssä tulokset olivat oletuksen mukaisia. Kahden eri fosforylaation reaktiossa huomattiin, että universaali inhibiittori toimii kummallekin entsyymille hyvin, ja onnistuu estämään entsyymin toimintaa jopa paremmin kuin entsyymien spesifiset inhibiittorit yhdessä. Näin ollen voidaan todeta, että universaali inhibiittori toimii.

Myös kahden peräkkäisen reaktion (fosforylaatio ja defosforylaatio) tuloksia voidaan pitää loogisina, sillä ne vastaavat yksinkertaisten määrittelysten vastaavia tuloksia. Ilman inhibiittoria defosforylaatioreaktio antaa suuren signaalin, sillä fosfataasi pääsee irrottamaan fosfaattiryhmän peptidisubstraatista, jolloin peptidisubstraatti pääsee sitoutumaan europiumilla leimatun peptidin kanssa. Sammutinmolekyyli ei tällöin pääse reagoimaan europiumin kanssa, ja signaali on täten suuri. Inhibiittori estää entsyymin toimintaa, jolloin entsyymi ei pääse irrottamaan fosfaattiryhmää, sitoutumista ei tapahdu ja mitattu signaali on pieni.

Fosforylaatioreaktiossa puolestaan saadaan matala signaali ilman inhibiittoria. Kinaasientsyymi siirtää ATP:ltä fosfaattiryhmän peptidisubstraatille, jolloin sitoutuminen europiumilla leimattuun peptidiin ei onnistu. Sammutinmolekyyli pääsee reagoimaan europiumin kanssa, ja mitattu aikaerotteinen luminesenssisignaali on pieni. Kun inhibiittori estää kinaasientsyymin toimintaa, saadaan päinvastainen tulos. Inhibiittori kiinnittyy kinaasin aktiiviseen kohtaan estäen sen kiinnittymisen peptidisubstraattiin. Peptidisubstraatti voi siis sitoutua europiumilla leimatun peptidin kanssa, jolloin sammutinmolekyyli ei pääse reagoimaan europiumiin, ja mitattu signaali on suuri.

## 9 LOPPUPÄÄTELMÄT

Opinnäytetyössä lähdettiin kehittämään homogeenistä kinaasimäärittymenettelmää tehoseulontaan käyttäen hyväksi sammutusresonanssienergiansiirtotekniikkaa. Tavoitteena oli saada defosforylaatioreaktio toimimaan ja löytää tyrosiinifosfataasille sen toimintaa estävät inhibiittorit sekä saada kaksi eri fosforylaatioreaktiota toimimaan samassa kuopassa ja etsimään näille yhteinen, universaali inhibiittori, joka estää kummankin entsyymin toiminnan.

Defosforylaatio saatiin toimimaan nopeasti niin, että signaalin ja taustan suhde oli suurempi kuin kolme. Testattiin yhteensä kolmea eri inhibiittoria entsyymin PTP1B toiminnan estämiseen. Kaksi testatuista inhibiittoreista toimi hyvin mutta kolmas aiheutti signaalin häiriötä sitoutumistestissä, ja tätä inhibiittoria ei testattu varsinaisessa reaktiossa. Inhibiittoria TCS-401 ei saatu verrattua kirjallisuusarvoihin, sillä sitä saatu  $IC_{50}$ -arvo tulisi ensin muuttaa  $K_i$ -arvoksi, johon tarvitaan uusi määrittely, jota ei tässä opinnäytetyössä tehty.

Kaksoismäärittely saatiin toimimaan hyvin. Kaksi fosforylaatioreaktiota samassa kuopassa hyvin eivätkä ne aiheuttaneet toisilleen häiriötä. Toinen entsyymeistä oli tyrosiinikinaasi ja toinen fosforyloi seriiniä ja treoniinia. Kummankin entsyymin spesifinen inhibiittori toimi hyvin niin ainoana inhibiittorina kuin myös kummankin inhibiittorin ollessa reaktiossa mukana. Universaali inhibiittori, joka estää kumpaakin entsyymiä toimimasta, toimi hyvin. Universaali inhibiittori näytti jopa estävän entsyymien toimintaa paremmin kuin kaksi spesifistä inhibiittoria samassa kuopassa. Mikäli universaali inhibiittori onnistui estämään 100 % entsyymien toiminnasta, kaksi spesifistä inhibiittoria onnistuivat estämään vain noin 80 %. Joka tapauksessa universaali inhibiittori staurosporiini estää kinaasien EGFR ja PKA toimintaa.

## LÄHTEET

Aletta, J. M.; Cimato, T. R.; Ettinger, M. J. 1998. Protein methylation: signal event in post-translational modification. *Trends in Biochemical Sciences*, Volume 23, Issue 3, 89-91.

BioAssay Systems. 2012. Sodium Orthovanadate (PHIVA-1mL). Stable and Potent Phosphatase Inhibitor. Viitattu 11.4.2016: <https://www.bioassaysys.com/Datasheet/PHIVA.pdf>

Bowen, R. 2003. Protein Kinase A. Viitattu 3.4.2016: <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/molecules/pka.html>

Brock, T. 2010. Protein Acetylation: Much More than Histone Acetylation. Cayman Chemicals. Viitattu 21.3.2016: <https://www.caymanchem.com/article/2152>

Cer, R. Z; Mudunuri, U; Stephends, R & Lebeda, F. J. 2009. IC50-to-Ki: a web-based tool for converting IC50 to Ki values for inhibitors of enzyme activity and ligand binding. *Nucleic Acids Research*, 1-5

DiscoverX. 2016. KINOMEScan® Assay Platform. Viitattu 12.5.2016: <http://www.discoverx.com/technologies-platforms/competitive-binding-technology/kinomescan-technology-platform>

Dohmen, R. J. SUMO protein modification. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research*, Volume 1695, Issues 1-3, 113-131.

Hay, R.T. 2001. Protein modification by SUMO. *Trends in Biochemical Sciences*, Volume 26, Issue 5, 332-333.

Heino, J. & Vuento, M. 2014. Biokemian ja solubiologian perusteet. Helsinki: Sanoma Pro Oy.

Horton, R. A. & Vogel, K. W. 2010. Multiplexing Terbium- and Europium-Based TR-FRET Readouts to Increase Kinase Assay Capacity. *Journal of Biomolecular Screening*, Volume 15 (8), 1008-1015.

Hunter, T. 1995. Protein Kinases and Phosphatases: The Yin and Yang of Protein Phosphorylation and Signaling. *Cell*, Vol. 80, 225-236.

Högmänder, M. 2013. Bakteerien kvantitointimenetelmän kehittäminen. Turun ammattikorkeakoulun opinnäytetyö.

Jacobino, J. 2011. In vitro -määrityksen kehittäminen  $\beta$ -amyloidien aggregaation havaitsemiseen. Turun ammattikorkeakoulun opinnäytetyö.

Jacobino, J. 2014. Uuden europium(III)kelaatin karakterisointi ja soveltuvuus aikerotteisiin fluoroimmunomäärityksiin. Poster. Biokemian laitos, Turun yliopisto.

Kaplan, J. B.; Reinke, A. W. & Keating, A. E. 2014. Increasing the affinity of selective bZIP-binding peptides through surface residue redesign. *The Protein Society*, Vol 23, 940-953.

Karolin, E. & Vertegaal, A.C.O. 2015. SUMOylation-Mediated Regulation of Cell Cycle Progression and Cancer. *Trends in Biochemical Sciences* Volume 40, Issue 12, 779-793.

Kehoe, J. W. & Bertozzi, C. R. 2000. Tyrosine sulfation: a modulator of extracellular protein-protein interactions. *Chemistry & Biology*, Volume 7, Issue 3, R57-R61.

Kopra, K. & Härmä, H. 2015. Quenching resonance energy transfer (QRET): a single-label technique for inhibitor screening and interaction studies. *New Biotechnology*, Volume 32, Issue 6, 575-580.

Krylov D. & Vilson C. 2001. Leucine Zipper. Encyclopedia of Life Sciences.

Lessard, L.; Stuble, M. & Tremblay, M. L. 2010. The two faces of PTP1B in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics*, Volume 1804, Issue 3, 613-619.

Llorca, C. M.; Potschin, M. & Zentgraf, U. 2014. bZIPs and WRKYs: two large transcription factor families executing two different functional strategies. *Frontiers in plant science*. Volume 5, Article 169, 1-14.

Mandal, A. 2013. Acetylation of Proteins. *News Medical*. Viitattu 21.3.2016: <http://www.news-medical.net/health/Acetylation-of-Proteins.aspx>

Mikkonen, L. 2013. SUMO-1 conjugation in normal and stress conditions in vivo. Helsinki University Biomedical Dissertations No. 182.

Mostoslavsky, R. 2012. Protein Acetylation Signalin Pathway. *Cell Signaling Technology*. Viitattu 21.3.2016: <http://www.cellsignal.com/common/content/content.jsp?id=pathways-chromatin-acetylation>

New England BioLabs Inc. 2016. Sodium Orthovanadate (Vanadate). Viitattu 24.3.2016; <https://www.neb.com/products/p0758-sodium-orthovanadate-activated-vanadate>

Nissinen, M. 2011. Homogeeninen fluoresenssiin perustuva filamenttifaagin tiitterimääritys. Turun ammattikorkeakoulun opinnäytetyö.

PerkinElmer. 2015. LANCE® TR-FRET Assays. Viitattu 15.2.2016: <http://www.perkinelmer.com/catalog/category/id/lance%20reagents>

PhosphoSitePlus. 2013. EGFR (human). *Cell Signaling Technology*. Viitattu 3.4.2016: <http://www.phosphosite.org/proteinAction.action?id=592>

Promega. Technical Bulletin. 2015. Kinase-Glo® Luminescent Kinase Assay Platform. Viitattu 12.5.2016: <https://fi.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20bulletins/101/kinase%20glo%20luminescent%20kinase%20assay%20platform%20protocol.pdf>

R&D Systems. 2016. Universal Kinase Activity Kit. Viitattu 12.5.2016: <https://www.rndsystems.com/products/universal-kinase-activity-kit>

Santa Cruz Biotechnology. 2016. Sodium orthovanadate. Viitattu 13.4.2016: <http://www.scbt.com/datasheet-3540-sodium-orthovanadate.html>

Sigma-Aldrich. 2016. Product Information. Sodium orthovanadate. Viitattu 24.3.2016: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s6508?lang=fi&region=FI&gclid=CJWb1fia2csCFWF5cgod5QEleg>

SignalChem. Specialists in Signalin Proteins. PTPN1 (PTP1B), Active. Full-length human recombinant protein expressed in Sf9 cells.

Song, X. & Quirk, S. 2012. Time-Resolved Luminescence Detection and Imaging Promises a Bright Future. *Biosensors & Bioelectronics*. Volume 3, Issue 5.

Smith, Y. 2015. What is Ubiquitin? *News Medical*. Viitattu 22.3.2016: <http://www.news-medical.net/life-sciences/What-is-Ubiquitin.aspx>

Stone, M.J.; Chuang, S.; Hou, X.; Shoham, M. & Zhu, J. Z. 2009. Tyrosine sulfation: an increasingly recognized post-translational modification of secreted proteins. *New Biotechnology*, Volume 25, Issue 5, 299-317.

Suominen, I.; Pärssinen, R.; Haajanen, K. & Pelkonen, J. 2010. Geenitekniikka. Turun ammatti-korkeakoulun oppimateriaaleja 52. Saarijärven Offset Oy.

ThermoFisher Scientific 2016. Overview of Post-Translational Modifications (PTMs). Viitattu 8.2.2016: <https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-post-translational-modification.html>

Tocris. 2016. TCS 401. Viitattu 13.4.2016: <https://www.tocris.com/disprod.php?ItemId=5272>

Tong-Ochoa, N. 2015. Phosphorylation monitoring using homogeneous antibody-free kinase assay. Principles of Drug Discovery. University of Turku.

Tong-Ochoa, N. 2015. Research Plan.

Tong-Ochoa, N.; Kopra, K.; Syrjänpää, M.; Legrand, N. & Härmä, H. 2015. Homogeneous single-label tyrosine kinase activity assay for high throughput screening. Analytica Chimica Acta 897, 96-101.

Ukkola, O. & Santaniemi, M. 2002. Suojaako tyrosiinifosfataasi 1B:n esto lihavuudelta ja tyypin 2 diabetekselta?. Duodecim, 118, 1857-1862.

Venäläinen, R. 2015. Geenien toiminnan säätelytekijöitä. Otavan Opisto. Viitattu 28.1.2016: [http://opinnot.internetix.fi/fi/muikku2materiaalit/lukio/bi/bi5/2\\_solun\\_perinnollinen\\_toiminta/2.3\\_transkriptio\\_on\\_geenien\\_toiminnan\\_saatelyn\\_pullonkaula/2.3.3\\_transkriptiotekijat?C:D=hNcG.gWyK&m:selres=hNcG.gWyK](http://opinnot.internetix.fi/fi/muikku2materiaalit/lukio/bi/bi5/2_solun_perinnollinen_toiminta/2.3_transkriptio_on_geenien_toiminnan_saatelyn_pullonkaula/2.3.3_transkriptiotekijat?C:D=hNcG.gWyK&m:selres=hNcG.gWyK)